تعیین گونه عامل لیشمانیازیس جلدی به روش مولکولی در شهر مشهد

محمد رضا محمودی[1*]، جلیل توکلی افشار[2]، مسعود مهاجری[3]، عبدالمجید فتی[3]، محمد جواد یزدان پناه[4]، محمد تقی شاکری[5]، اسد میرزائی[1]

1) گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
2) گروه ایمنولوژی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
3) گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
4) گروه پوست، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
5) گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

تاریخ دریافت:**88/3/15** تاریخ پذیرش:**88/11/3**

چکیده

مقدمه: لیشمانیازیس جلدی به عنوان یک مشکل بهداشتی در بسیاری از نقاط ایران به ویژه شهر مشهد مطرح است. گونه های مختلفی از این انگل سبب ایجاد بیماری شده و تعیین گونه های آن جهت کنترل و پیشگیری مفید می باشد. اگرچه یافته های کلینیکی و اپیدمیولوژیک جهت شناسایی انگل لازم است اما به تنهایی کافی نیست، زیرا این مشکل ناشی از تشابه مورفولوژیک آماستیگوت و پروماستیگوت گونه های مختلف انگل لیشمانیا بوده ولی می توان با استفاده از تکنیکPCR اسید نوکلئیک کینتوپلاست(kDNA) آن ها را تعیین گونه نمود. مطالعه حاضر جهت تعیین گونه این انگل به روش PCR در شهر مشهد به مدت 12 ماه(1383-1382) در بخش انگل شناسی بیمارستان قائم و امام رضا و مرکز تحقیقاتی بوعلی در دانشگاه علوم پزشکی مشهد صورت گرفت.

مواد و روش ها: نمونه های به دست آمده از 21 بیمار مبتلا به لیشمانیازیس جلدی که به روش لام مستقیم بیماری آن ها تایید شده بود در محیط هایN.N.N و سپس RPMI-۱٦٤٠ کشت داده شدند. پس از کشت انبوه انگل و استخراج DNA به روش پروتئین کیناز نمونه ها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شدند. پس از آن محصول PCR بر روی ژل آگارز 2 درصد در دستگاه الکتروفورز منتقل شد و با استفاده از رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید باندهای DNA مشخص شد. حضور قطعه 620bp بیانگر لیشمانیا ماژور و قطعه 800bp نشان دهنده لیشمانیا تروپیکا می باشد.

یافته های پژوهش: از مجموع 21 نمونه مورد آزمایش، 19 مورد لیشمانیا تروپیکا و 2 مورد لیشمانیا ماژور تشخیص داده شدند.

بحث و نتیجه گیری: با توجه به نتایج، مشخص گردید که شهر مشهد با وجود اینکه تا کنون به عنوان یک کانون فرم خشک سالک شناخته می شد، اکنون ثابت گردید که در این شهر علاوه بر لیشمانیا تروپیکا، لیشمانیا ماژور هم وجود دارد. اما لیشمانیا تروپیکا گونه غالب بیماری در این شهر می باشد.

واژه های کلیدی: لیشمانیا ماژور، لیشمانیا تروپیکا، PCR، مشهد

***نویسنده مسئول:** گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

Email: mrmahmoodi۲۰۰۲@yahoo.com

مقدمه

لیشمانیا یک انگل تک یاخته است که انسان را آلوده کرده و ایجاد بیماری لیشمانیازیس می کند. لیشمانیازیس یکی از مهم ترین بیماری های گرمسیری است که در انسان به اشکال جلدی(سالک)، احشایی(کالا آزار) و جلدی مخاطی ظاهر می شود. ناقل این انگل پشه خاکی های فلبوتومینه در دنیای قدیم و لوتزومیا در دنیای جدید می باشند و مخازن آن جوندگان خانواده جربیلیده می باشند. بنا به گزارش سازمان بهداشت جهانی، لیشمانیازیس جلدی در 88 کشور جهان اندمیک می باشد و حدود 350 میلیون نفر در معرض خطر ابتلا به آن هستند و شیوع آن در جهان در حدود 12 میلیون نفر و بروز آن 1/5 میلیون نفر در سال می باشد. لیشمانیازیس جلدی در تمام کشورها به جز استرالیا و اقیانوس منجمد شمالی گزارش شده است اما بیشتر موارد بیماری مربوط به ایران، افغانستان، الجزایر، سوریه، عربستان، پرو و برزیل می باشد.(4-1)

لیشمانیوزیس خصوصا نوع جلدی، به صورت مشکل مهم بهداشتی در کشور ما مطرح می باشد و شمال شرق کشور به خصوص شهر مشهد از جمله کانون های آلودگی در کشور ما می باشد. این بیماری همه ساله علاوه بر ایجاد ضایعات پوستی در بیماران موجب اتلاف انرژی انسانی، پزشکی و بهداشتی همراه با اتلاف هزینه های مالی زیادی می شود.(۵،۶)

راه های پیشگیری و کنترل سالک بسته به گونه عامل بیماری متفاوت است از آن جایی که تشخیص گونه های عامل سالک به صورت میکـــــروسکوپی امکان پذیر نیست و شواهد اپیدمیولوژیک و بالینی هم به تنهایی ابزار مناسبی برای تعیین گـــــونه انگل نمی باشد،(7). لذا لازم است روش های دقیق مولکولی و بیوشیمیایی را در کنار این شواهد جهت تشخیص دقیق گونه انگل مورد استفاده قرار داد که میان این روش ها PCR جایگاه ویژه ای دارد.

در مورد گونه های عامل سالک در شهر مشهد بررسی هایی صورت گرفته که از آن جمله، مطالعه مهاجری و همکاران در سال 1378 بود و وجود لیشمانیا ماژور به روش ایزو آنزیم الکتروفورزیس در شهر مشهد تایید شد،(8). همچنین در سال 1380 در شهر مشهد از روش الایزا جهت تعیین گونه انگل استفاده شد،(9). از آن جائی که مشهد را کانون خشک می دانسته اند و حال با توجه به تغییرات جمعیتی، حاشیه نشینی، رفت و آمدها و تغییرات اقلیمی و غیره، اشکال کلینیکی بیماری متغییر و متفاوت شده است در نتیجه بر آن شدیم که گونه های عامل سالک را با روش حساس و مولکولی PCR هم مورد بررسی قرار دهیم که ضمن راه اندازی یک روش دقیق جهت تعیین گونه انگل، زمینه برای تحقق پیشگیری و کنترل بیماری در مناطق آلوده فراهم می شود.

مواد و روش ها

این مطالعه توصیفی در طول 1382-1383 در بخش انگل شناسی بیمارستان امام رضا(ع) بیمارستان قائم و بخش بیولوژی سلولی و مولکولی پژوهشکده بوعلی دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام گردید.

به منظور انجام این مطالعه، از بیماران مشکوک به سالک مراجعه کننده به بیمارستان های فوق و مراکز بهداشتی مشهد، ضمن تکمیل فرم پرسش نامه نمونه گیری انجام شد. که این فرم های تکمیل شده برای هر بیمار، اطلاعات قابل توجهی در رابطه با عوامل مختلفی مثل سن، جنس، سابقه بیماری در گذشته، مدت ابتلا، محل سکونت، سابقه مسافرت در 6 ماه گذشته و دیگر فاکتورهای مستعد کننده احتمالی و نیز شیوع و خصوصیات بالینی بیماری در این جمعیت را در اختیار قرار داد. 57 نفر بیمار مشکوک به سالک مورد بررسی قرار گرفتند. از این تعداد، نمونه کشت 21 نفر که به مرحله انبوه رسید، جهت ادامه مطالعات مورد استفاده قرارگرفت.

نحوه نمونه‌برداری و کشت انگل

در این مطالعه از ضایعات افراد دارای زخم سالک جهت تهیه لام مستقیم و رنگ آمیزی و تکثیر انبوه انگل نمونه برداری صورت گرفت. مقداری از نمونه بر روی لام منتقل شده و با الکل متیلن 90 درصد ثابت شد و سپس به روش گیمسا رنگ‌آمیزی گردید،(6). سپس در شرایط استریل، یک قسمت از نمونه در محیط NNN، کشت داده شد. محیط مذکور را در دمای 25 درجه سانتیگراد قرار داده و پس از 72-48 ساعت رشد انگل بررسی گردید.

در محیط کشت دی فازیک NNN، انگل در عرض 3 تا 6 روز ظاهرمی گردید. پس از انتقال انگل به محیط کشت مایع غنی شده RPMI-1640،(۹،۱۰). انگل ها پس از چند روز سازگار می‌شدند و شروع به تکثیر فراوان می‌نمودند. جهت استخراج DNA انگل نیاز به 2-1 میلیون پروماستیگوت بود که به این منظور باید انگل های موجود در محیط کشت RPMI-۱٦٤٠ مورد شمارش قرار می گرفت.

استخراج DNA و انجام PCR

جهت استخراج DNA انگل، نمونه کشت حاوی انگل لیشمانیا را که داخل میکروتیوپ های 1/5cc ریخته شده به مدت 10 دقیقه در 10000 rpm سانتریفوژ نموده سپس مایع رویی را خارج نموده و پلیت سلولی در ته میکروتیوپ مشاهده می شود. در مرحله بعد 150 لاندا از بافر لیز کننده ۱mM, mM Tris- EDTA(PH ۸) ,٪۱ Tween ۲۰) 50Hcl(PH ۷،٦)، محلول پروتئین کیناز mg/ml k 19) پلیت سلولی اضافه نموده و در 55 درجه سانتیگراد به مدت 3 ساعت یا 37 درجه سانتیگراد به مدت 19 ساعت قرار می گرفت.

در مرحله بعد به لیزات حاصل، محلول فنل و کلروفرم که با حجم مساوی با یکدیگر مخلوط شده‌اند اضافه گردید. پس از سانتریفوژ، فاز آبی که در بالا قرار داشت با دقت به میکروتیوپ جدید منتقل می‌شد. چنان چه در حین انتقال، مقداری فنل یا پروتئین به همراه نمونه انتقال پیدا می کرد مجدداً نمونه سانتریفوژ می گردید. در مرحله بعد جهت خذف املاح و تغلیظ DNA از محلول استات 3 مولار و اتانل سرد استفاده شد.(11)

DNA حاصل را در 50 میکرولیتر آب مقطر استریل حل نموده و یک ساعت 37 درجه سانتی گراد قرار می گرفت. این مواد در فریزر و به صورت منجمد نگهداری می‌شد.

روش انجام PCR جهت تعیین گونه انگل لیشمانیا

مراحل زیر طبق دستور العمل شرکت سازنده کیت(شرکت سینا ژن ایران) انجام شد. بر این اساس میکروتیوپ ها جهت کنترل مثبت و کنترل منفی علامت‌گذاری شدند و به تعداد نمونه ها میکروتیوپ آماده نموده و به هر کدام از آن ها ۱ X PCR Mix ۲۰µl، ۰،۳ µl Taq–DNA Poly اضافه شد. سپس نمونه‌ها را چند ثانیه در میکروسانتریفوژ قرار داده و پس از افزودن 5 لاندا از DNA و سانتریفوژ مجدد، در دستگاه ترموسایل PCR قرار داده شد.

در مرحله آخر، ۵µl از محصول PCR را روی ژل آگارز 2 درصد حاوی اتیدیوم بروماید منتقل نموده و باندهای ایجاد شده توسط نمونه‌ها، با باند ایجاد شده توسط مارکر در دستگاه UV ترانس لومیناتور مقایسه گردیدند. طبق دستور العمل کیت، حضور قطعه bp 625 بیانگر لیشمانیا ماژور و قطعه bp 800 نشان دهنده لیشمانیا تروپیکا می باشد.

یافته های پژوهش

در این مطالعه، از بین 53 بیماری که به روش لام مستقیم یا کشت از نظر وجود جسم لیشمن تأیید شده بودند، 22 نفر مونث و 31 نفر مذکر بودند. بیش از 90 درصد بیماران دارای زخم خشک بودند. در47/6 درصد افراد 2ـ1 ضایعه و 38/1 درصد افراد 4-3 ضایعه و 14/3درصد افراد بیش از 4 ضایعه مشاهده گردید.

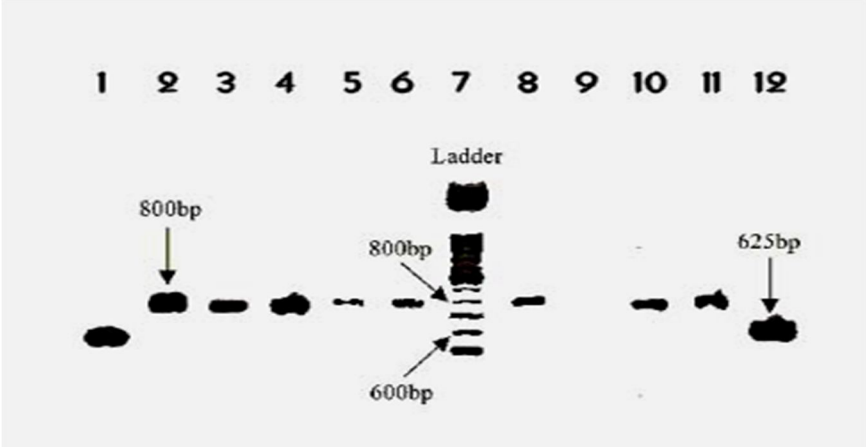
هم چنین آزمایشات PCR بر روی 21 نمونه ای که کشت انبوه داده شدند صورت گرفت و 19 نمونه لیشمانیا تروپیکا و 2 نمونه لیشمانیا ماژور شناسایی گردید.

فراوانی اشکال بالینی ضایعه در افراد مبتلا به لیشمانیوز در شهر مشهد سال 1383

فرم بالینی ضایعه	مونث		مذکر		کل	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
خشک	11	100	7	70	18	85/7
مرطوب	0	0	2	20	2	9/5
لو پوئید	0	0	1	10	1	4/8
کل	11	100	10	100	21	100

100%
80%
60%
40%
20%
0%
تروپیکا
ماژور

درصد گونه های مختلف انگل لیشمانیا در شهر مشهد1383



نتیجه الکتروفورز نمونه ها روی ژل آگارز رنگ آمیزی شده با اتیدیوم برو ماید.
شماره 7 باند حاصل از 100 Ladder، کنترل منفی:شماره 9، شمـاره 6: کنترل مثبت، و نمونه های ۱،۲،۳،٤،٥،۸،۱۰،۱۱،۱۲، نمونه ای بیماران می باشد

بحث و نتیجه گیری

به علت تعدد و تشابه شکلی عامل بیماری شناسایی گونه های انگل در اتخاذ برنامه های پیشگیری و کنترل بیماری موثر می باشد. هم چنین رده بندی آن به گونه ها و سویه های متفاوت بسیار مشکل است و شواهد اپیدمیولوژیکی و بالینی نیز به تنهـــایی در افتراق میان گونه ها کارساز نمی باشد. روش های مولکولی تحول عظیمی در تعیین هویت انگل ایجاد نموده است.(۴،۹،۱۲)

از سویی در دو دهه اخیر سیمای اپیدمیولوژیک لیشمانیوز پوستی در ایران دچار تغییر و تحول شده است. این تغییرات ناشی از جابه جایی جمعیت بیـــــن مناطق شهری و روستایی، هجوم پناهندگان کشورهای همسایه نظیر افغانستان و عراق می باشد.(۴،۵)

در این بررسی از روش PCR Directed برای شناسایی انگل های لیشمانیایی جدا شده از افراد مبتلا به لیشمانیازیس پوستی استفاده شده است.

استفاده از PCR جهت شناسایی گونه‌های لیشمانیا در مناطق دیگری از کشور و دنیا انجام گرفته است. در مطالعه ای که حجازی و همکاران درسال 1379 در شهر اصفهان انجام دادند 120 ایزوله انگل به روش پادتن های تک دودمانی اختصاصی مورد بررسی قرار گرفت که تعدادی از نمونه ها به منظور تأیید داده‌های حاصل از روش فوق با روش PCR و الکتروفورز ایزوآنزیم ها مورد بررسی قرار گرفت.

از مجموع 120 نمونه، 100 مورد عامل بیماری لیشمانیا ماژور و 8 مورد لیشمانیا تروپیکا بوده است و در 12 مورد نتایج مشکوک حاصل شد که تعیین هویت این گونه‌های مشکوک با روش PCR و الکتروفورز ایزوآنزیم ها انجام خواهد شد.(12)

معتضدیان و همکاران در سال 2002 با استفاده از روش PCR انگل لیشمانیا را مورد شناسایی قرار دادند. در این تحقیق با استخراج DNA از گسترش های رنگ‌آمیزی شده باگیمسا و انجام PCR به بررسی ارزش PCR با پرایمرهای اختصاصی در تشخیص لیشمانیازیس پوستی پرداخته شد.

جهت این امر 92 گسترش رنگ‌آمیزی شده با گیمسا که از افراد مشکوک به لیشمانیازیس پوستی تهیه شده بود مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت نشان داده شد که کلیه نمونه‌های تهیه شده از اسلایدهای دارای انگل همگی با PCR نیز مثبت شدند و 4 نمونه فاقد انگل نیز مثبت گردیدند. بدین ترتیب به نظر می‌رسد که تکنیک PCR یک روش مناسب جهت تشخیص بیماری لیشمانیوز پوستی به خصوص در زخم های مزمن و کم انگل و فرم های خاص بیماری مانند لوپوئید می باشد و با توجه به حساسیت و ویژگی این تست، دارای ارزش تشخیص خوبی است. هم چنین می توان جهت تهیه DNA از بیماران و یا مخازن حیوانی از این روش بهره برد.(11)

مهاجری و همکاران در سال 1378با روش ایزوآنزیم الکتروفورزیس،(8). و فتی و همکاران در سال 1382 به روش منو کلونال آنتی بادی،(7). و حجاران و همکاران در سال 1383 به روش(RAPD-PCR)،(13). گونه های عامل لیشمانیازیس در شهر مشهد را مورد بررسی قرار دادند که لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا ماژور مورد شناسایی قرار گرفتند و لیشمانیا تروپیکا به عنوان گونه غالب مورد شناسایی قرار گرفت.

در مطالعه حاضر با توجه به اینکه، بیشتر بیماران دارای 1الی 2 ضایعه بوده اند و اکثر آن ها بیش از 2 ماه از زمان ابتلا آن ها گذشته بود و همین طور نتایج حاصل از PCR همگی موید این مطلب است که عفونت غالب در مشهد نوع لیشمانیا تروپیکا می‌باشد. از طرفی نتیجه این مطالعه موید این موضوع نیز می با شد که لیشمانیا ماژور هم بومی شهر مشهد می باشد و با مطالعات قبلی و مطالعه شهبازی و همکاران،(14). هم خوانی دارد.

بنابراین نتایج مطالعات گذشته، در مطالعه حاضر نیز با انجام روش دقیق مولکولی تایید گردید. از آن جائی که مشهد را کانون سالک خشک می دانسته اند، ولی با مطالعه صورت گرفته، می توان بیان کرد که، تغییرات جمعیتی، حاشیه نشینی، رفت و آمد ها و تغییرات اقلیمی و غیره، موجب گردیده که اشکال کلینیکی بیماری متغییر و متفاوت گردد و اکنون باید گفت که شهر مشهد کانون هر دو نوع انگل می باشد.

پیشنهاد

ـ PCR در شناسایی گونه‌ها توانایی بسیار زیادی دارد. برای پیشگیری و مبارزه با بیماری در نقاط دیگر استان، انجام تحقیقات تخصصی مانند PCR جهت تعیین گونه پیشنهاد می‌گردد.

ـ از آن جائی که DNA را می توان سال ها در یخچال نگهداری نمود، می توان یک بانک DNA از هر انگل تهیه نمود و دیگر نیازی به نگهداری انگل زنده نمی‌باشد.

ـ با توجه به این که مخزن لیشمانیا تروپیکا(انگل غالب در شهر مشهد) انسان و سگ(میزبان اتفاقی) می‌باشد، بنابراین شناسایی و درمان بیماران مبتلا به سالک دارای اهمیت بیشتری است و در مرحله بعد جمع‌آوری سگ های ولگرد مؤثر می‌باشد.

- با توجه به اینکه لیشمانیا ماژور هم در مشهد وجود دارد پس باید کنترل جوندگان نیز مورد توجه قرار گیرد.

سپاسگزاری

این تحقیق با امکانات دانشگاه علوم پزشکی مشهد، انجام گرفت نویسندگان از مرکز فوق الذکر و همچنین از آقایان محمدمهدی اکبری، مجید گنج بخش، دکتر امیر علی آریان و سرکار خانم بروک کمال تشکر و سپاس را دارند.

References

۱-Baily M, Lockwood S D N J. Cutaneous Leishmaniasis. Clinics in Dermathology ۲۰۰۷; ۲۵; ۲۰۳-۱۱.

۲-Tashakori M, Katrin K, Al-Jawabreh A, Mauricio I, Schonian G, Farajnia S, et al. Leishmania major: genetic heterogenesity of Iranian isolates by single-strand conformation polymorphism and sequence analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer. Acta Tropica ۲۰۰۶; ۹۸: ۵۲-۸.

۳-Purmohammadi B, Motazedian MH, Kalantari M. Rodent infection with leishmania in a new focus of human cutaneous leishmaniasis in northern Iran. Ann Trop Med Parasitol ۲۰۰۸;۱۰۲(۲):۱۲۷-۳۳.

٤-Javaheri A. [Isolation of leishmania major by isoenzyme electrophoresis method in Mashhad]. Faculty of Medicine. MSc Thesis, Mashhad University of Medical Sciences. ۲۰۰۱.p.۱-٤۰.(persian)

۵-Valizadeh M. [A study on leishmania species causing cutaneous leishmaniasis in Mashhad using specific monoclonal antibodies]. MSc Thesis. Tarbiat Modares University. ۲۰۰۳.p.۸۹-۹۱.(persian)

٦-Nadim A, Rezaei HR. [Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Iran. In: Azizi F. Epidemiology of prevalent diseases in Iran]. Chap. ٤, ۲nd ed. Iran; SBMU Publ ۱۹۹٤. (persian)

۷-Fata A, Dalimi A, Jaafari M. [Correlation between clinical appearance, leishmanin test & ELISA using monoclonal antibody in diagnosis of different forms of cutaneous leishmaniasis]. Medical J; Mashhad Univ. of Med Sci ۲۰۰٤; ۸۳٤۷(۱): ۱۹-۲۷.(persian)

۸-Mohajery M, Hatam GR. [Identification of leishmania major by isoenzyme electrophoresis method]. Med J; Mashhad Univ iversity of Med Sci ۲۰۰۵; ۸۸:۱۷۷-۸٤. (persian)

۹-Valizadeh M. [A study on leishmania species causing cutaneous leishmaniasis in Mashhad using specific monoclonal antibody]. Modarres J Med Sci ۲۰۰۵; ۷: ۱۰۷-۱۳. (persian)

۱۰-Eisenberger CL, Jaffe CL. Leishmania: identification of old world species using a permissively primed intergenic polymorphic-polymerase chain reaction. Exp Parasitol ۱۹۹۹; ۹۲:۱۵۹-٦٤.

۱۱-Motazedian H. DNA extraction and amplification of leishmania from archived, giemsa-stained slides, for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis by PCR. Ann Trop Med Parasitol ۲۰۰۲; ۹٦(۱): ۳۱-٤.

۱۲-Alvar J, Barker JR. Molecular tools for epidemiological studies and diagnosis of leishmaniasis and other selected parasitic diseases. Trans R Soc Trop Med Hyg ۲۰۰۲; ۹٦, (Suppl. ۱): S۱-S۲۵۰.

۱۳-Hejazi H, Nasrifar P, Jamali S. [Identification of leishmaniasis species using monoclonal antibodies in Isfahan]. Arch Ira Med ۲۰۰۱; ٤(۲):۱۰۱-۲. (persian)

۱٤-Hajjaran H, Mohebali M, Razavi M. [Identification of leishmania species isolated from human cutaneous leishmaniasis, using random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR)]. Iranian J Public Health ۲۰۰٤; ۳۳(٤): ۸-۱۵. (persian)

۱۵-Shahbazi F. Evaluation of PCR assay in diagnosis and identification of cutaneous leishmaniasis: a comparison with the parasitological methods. Parasitol Res ۲۰۰۸; ۱۰۳(۵):۱۱۵۹-٦۲.

Molecular Identification of Leishmania Species Causing Cutaneous Leishmaniasis in Mashhad, Iran

Mahmoodi MR[1], Tavakoli Afshar J[2], Mohajeri M[3], Fati AM[3], Yazdanpanah MJ[4], Shakeri MT[5], Mirzaei A[1]*

(Received: 5 Jul. 2009 Accepted: 24 Jan. 2010)

Abstract

Introduction: Cutaneous leishmaniasis is considered an important health problem in many parts of Iran, especially in Mashhhad. Various species of leishmania are causing the disease. Identification of leishmania is helpful for the control and prevention of the disease. Althought epidemiological and clinical findings are necessary, they are not sufficient for identification of cutaneous leishmaniasis. Difficulties in identification of these parasites, due to the similar morphology of amastigote and promastigote in different species, have been solved by using molecular techniques such as PCR amplification of kDNA. In order to identify leishmania species causing CL in Mashhad by a definite molecular technique (PCR method), a study was undertaken over a 12 months period (Apr. 2004- Feb. 2005) in department of Parasitology, Ghaem hospital, and Bu-Ali Research Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

Materials & Methods: A total of twenty one patients were recruited and samples were isolated and cultured in N.N.N medium followed by sub-cultur in RPMI-1640. Then, DNA was extracted by protein as k and amplified by specific primers of kDNA. The PCR product was analysed by gel electrophoresis using 2% agarose. The gel was stained with ethidium bromide and visible band with the presence of 620 bp fragment indicates of leishmania major and 800 bp indicates of leishmania tropica.

Findings: The results indicated that 19 of the isolates were identified as L. tropica and the other two were identified as L. major.

Discussion & Conclusion: As demonstrated by previous investigations, Mashhad had been known as an endemic focus for anthroponotic cutaneous leishmaniasis (ACL); however, it is now concluded that both ACL and zoonotic cutaneous leishmaniasis (ZCL) are present in Mashhad and L. tropica is the dominant species.

Key words: leishmania major, leishmania tropica, polymerase chain reaction(PCR), Mashhad

1.*Dept of Parasitology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

2.*Dept of Immunology, Bu Ali Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran*

3.*Dept of Parasitology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran*

4.*Dept of Dermatology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran*

5.*Dept of Social Medicine, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran*

**(corresponding author)*