

تشخیص میکروسکوپی و تعیین هویت مولکولی انگل لیشمانیا با هدف قرار دادن ژن ITS-rDNA در بیماران مشکوک به لیشمانیوز جلدی در استان فارس

احمد بقائی^۱، احسان سیدان جاسبی^۲، محمد آخوندی^{۳*}، هانیه میرزا^۴، امید دهنام^۵

- ۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم
- ۲- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم
- ۳- دکتری انگل شناسی، دانشگاه Reims فرانسه
- ۴- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان
- ۵- کارشناس بهداشت مبارزه با بیماری‌ها، مرکز بهداشت شهرستان قیر و کارزین

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۴/۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۸/۱۵

چکیده

مقدمه: استان فارس از مهمترین کانون‌های لیشمانیوز در ایران می‌باشد که هر دو نوع بیماری لیشمانیوز جلدی (شهری و روستایی) و احشایی به صورت اندمیک وجود دارد. جهت تشخیص آلودگی لیشمانیایی بیماران مشکوک جلدی شهرستان‌های شیزار، فیروزآباد، قیر و کارزین، فراشبند و لارستان و جهت تعیین گونه انگل، از روش‌های میکروسکوپی و مولکولی توأمً استفاده شد.

روش بررسی: پس از تهیه گسترش از ضایعه فعال بیمار و رنگ‌آمیزی گیمسا، آماتیگوت‌های انگل با استفاده از میکروسکوپ نوری مشاهده و گسترش‌ها براساس فراوانی انگل در جهابندی شدند. DNA انگل از گسترش، استخراج و PCR استاندارد با تکثیر قطعات ژنی ITS1-5.8s-ITS2 انجام شد. آمپلیکون‌ها توسط الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵٪ مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج: از ۳۴ بیمار مورد بررسی، ۲۹ مورد (۸۵٪) در آزمایش میکروسکوپی و ۳۲ مورد (۹۴٪) با آزمایش مولکولی مثبت بودند که ۱ مورد (۳٪)، گونه لیشمانیا تروپیکا و بقیه لیشمانیا میجر تشخیص داده شدند. بیشترین تعداد ضایعه ناشی از لیشمانیا میجر، در قسمت پا و سپس در قسمت دست بیماران بوده در حالی که ضایعه ناشی از لیشمانیا تروپیکا، در قسمت پیشانی بوده است.

نتیجه‌گیری: استخراج DNA از گسترش‌های تهیه شده از زخم فعال بیماران جلدی (سنجهش میکروسکوپی)، نیاز به حفظ و انتقال انگل به محیط کشت را مرتفع می‌سازد. ضمناً توالی تکثیر شده در این مطالعه، به دلیل دارای بودن دگرگونی‌های درون ژنی و ایجاد قطعاتی با اندازه متفاوت، موجب ایجاد تمایز میان دو گونه لیشمانیا میجر و لیشمانیا تروپیکا می‌گردد. با انجام این مطالعه، وجود گونه‌های لیشمانیا میجر و لیشمانیا تروپیکا به عنوان عامل بیماری لیشمانیوز جلدی در مناطق مورد مطالعه استان فارس تأیید شد.

واژه‌های کلیدی: لیشمانیوز جلدی، لیشمانیا میجر، لیشمانیا تروپیکا، ITS-rDNA، استان فارس

* (تویینده مسئول)، تلفن: ۰۰۳۶۷۹۰۰۰۲۰۷، پست الکترونیکی: m.akhoudi@yahoo.com

مقدمه

اما در دو سال اخیر مواردی از بیماری در شهر شیراز و مناطق شمالی آن مشاهده شده است. تعداد بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی در استان فارس در سال ۱۳۸۷، ۴۱۵۸ مورد بوده است که این تعداد در سال ۱۳۸۹، ۴ درصد افزایش یافته است(۱۱). کاربردی‌ترین روش تشخیص آزمایشگاهی این بیماری، فراهم کردن اسلامیدهای رنگ‌آمیزی شده با گیمسا از زخم بیمار و مشاهده میکروسکوپی آماتستیگوت است.

مشخصات گونه‌های مختلف جنس لیشمانیا به عوامل متعددی از قبیل توزیع جغرافیایی انگل، تظاهرات بالینی و اپیدمیولوژی بیماری، ناقل و مخزن حیوانی بستگی دارد(۱۲،۱۳). انگل‌های لیشمانیا از نظر شکل ظاهری قابل تفکیک نیستند و تا پیش از توسعه روش‌های جدید، شناسایی و تفکیک گونه‌های انگل بر عالم بالینی، اپیدمیولوژی بیماری، بررسی ناقلين، توانایی ایجاد بیماری در حیوانات آزمایشگاهی و رشد در محیط کشت، استوار بود که عمدتاً نیازمند صرف زمان و هزینه بالایی است(۱۴).

ابداع روش جدید بیوشیمیایی در استفاده از مشخصات ایزوآنزیمی تا حد زیادی کار را آسان نمود. اگر چه روش ایزوآنزیمی نیز خود دارای محدودیت‌هایی است(۱۵).

امروزه با پیشرفت روش‌های مولکولی از جمله PCR، تکنیک‌های متعدد و مارکرهای مولکولی متفاوتی جهت سنجش و تمایز گونه‌های جنس لیشمانیا توسعه یافته است(۱۶). تاکنون DNA ریبوزومی(۱۷)، اسپیسرهای داخلی برای رونویسی یا مناطق ITS(۱۸)، ژن توبولین(۱۹)، ژن gp63(۲۰)، مایکروستلاتیت DNA(۲۱) و خارج کروموزومی، مانند kinetoplast DNA (kDNA) minicircles (۲۲،۲۳) به عنوان ژن‌های هدف جهت تشخیص انگل لیشمانیا به کار گرفته شده‌اند. در این مطالعه به منظور شناسایی و تعیین هویت گونه لیشمانیا، روش PCR استاندارد با هدف قراردادن ژن ITS-rDNA به کار گرفته شد.

روش بررسی

استان فارس در جنوب ایران بین مدارهای ۲۷ درجه و ۲

لیشمانیوز یکی از ۶ بیماری مهم گرسنگی می‌باشد که به اشکال جلدی (سالک)، احشایی (کالا آزار) و جلدی - مخاطی ظاهر می‌شود. این بیماری در ۸۸ کشور جهان در قاره‌های آسیا، اروپا، آفریقا و آمریکا دیده می‌شود(۱۰،۲). لیشمانیوز جلدی به عنوان یکی از مشکلات عمدۀ بهداشتی در بسیاری از کشورهای جهان از جمله ایران مطرح است. سالانه ۱ تا ۱/۵ میلیون مورد جدید مبتلا به لیشمانیوز جلدی گزارش می‌گردد که حدود ۹۰٪ موارد در ۸ کشور جهان (افغانستان، برباد، ایران، پرو، عربستان سعودی، سوریه، الجزایر و سودان) رخ می‌دهد(۴).

در ایران، لیشمانیوز جلدی (ZCL) ناشی از لیشمانیا میجر (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) مغلب بهداشتی جدی و رو به افزایش است که در مناطق روستایی ۱۵ استان از ۳۱ استان کشور به صورت اندمیک وجود دارد(۵،۶). مهم‌ترین کانون‌های اندمیک بیماری، مناطق ترکمن‌صحراء و لطف‌آباد در شمال شرق ایران، ابردز و رامین، اصفهان و یزد در مرکز ایران، فارس و سیستان - بلوچستان در جنوب و جنوب شرق و ایلام و خوزستان در جنوب غربی کشور واقع شده‌اند(۱۰-۷).

لیشمانیوز جلدی (ACL) با عامل لیشمانیا تروپیکا در برخی از نقاط دنیا به خصوص در کانون‌های اندمیک منطقه خاورمیانه شایع است. چرخه انتقال این گونه از انگل در مناطق مختلف، متفاوت بوده و به طور کلی به یک مخزن حیوانی نیاز نیست. برخی از مهم‌ترین کانون‌های این بیماری در ایران، در استان‌های تهران، خراسان رضوی، فارس و کرمان واقع هستند(۷،۸).

استان فارس به عنوان یکی از مهم‌ترین کانون‌های لیشمانیوز و تنها کانون بیماری در ایران می‌باشد که در آن هر دو نوع بیماری (لیشمانیوز جلدی به شکل شهری و روستایی و لیشمانیوز احشایی) به صورت اندمیک وجود دارد. براساس آمار وزارت بهداشت، ۲۳ درصد بروز سالانه بیماری لیشمانیوز جلدی کشور از استان فارس گزارش می‌شود. آمارها نشان می‌دهد در سال‌های گذشته شیوع بیماری بیشتر در روستاهای جنوب استان فارس مربوط به شهرستان‌های خنج، فراشبند و لار بوده،

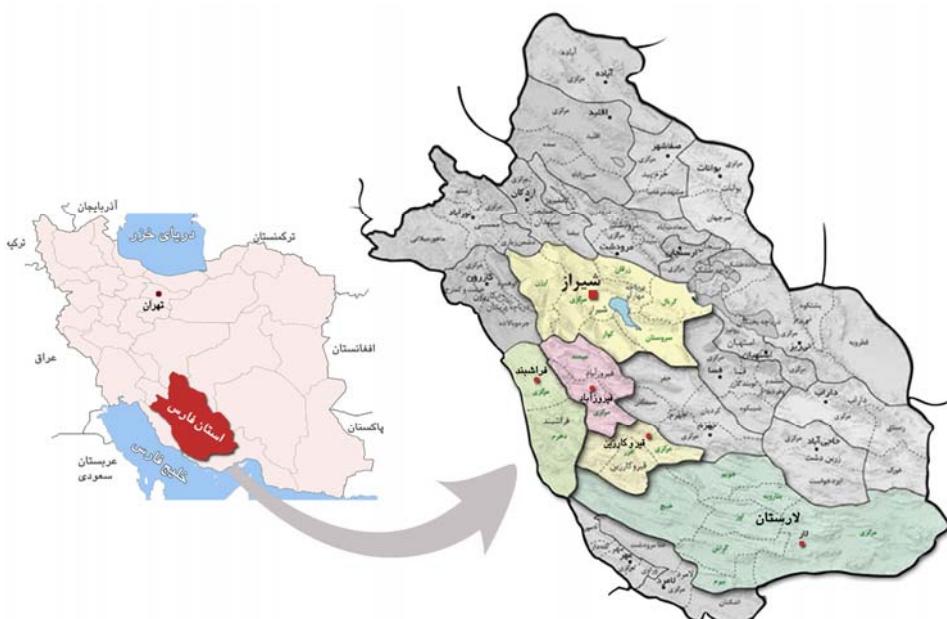
شد. چنانچه زخم پوشیده از عفونت باکتریایی یا قارچی بود، قسمت مورد نظر برای نمونه برداری از ضایعات عفونی پاک می شد. به کمک لست یکبار مصرف استریل، از لبه و حاشیه زخم در جهت مرکز به حاشیه شکافی در زیر ناحیه متورم ایجاد، سپس مقداری از سروزیته توسط لست به سطح لام منتقل گردید و به خوبی پخش شد(۲۴). نمونه برداری طوری انجام شد که حتی المقادیر در نمونه خون وارد نگردد. بلافاصله نام و شماره بیمار در کنار لام نوشته می شد.

برای مشاهده میکروسکوپی و درجه بندی لامهای رنگ آمیزی شده، اسمیرهای تهیه شده از ضایعات بیمار با متابول ۹۵٪ به مدت ۳۰ ثانیه فیکس گردیدند و سپس با رنگ گیمسا (رقت ۱:۱۰ با آب مقطر) به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه رنگ آمیزی شدند. پس از رنگ آمیزی، لامها با آب شسته شده و بعد از خشک شدن، آماتیگوت های انگل روی لام در زیر میکروسکوپ نوری با روغن ایمرسیون و درشت نمایی $\times 1000$ جستجو شد. لامها بر اساس فراوانی انگل از $1+ \text{ تا } 6+$ درجه بندی شدند(۲۵).

دقیقه و ۳۱ درجه و ۴۲ دقیقه عرض شمالی و ۵۰ درجه و ۵۵ درجه و ۳۶ دقیقه طول خاوری از نیمروز گرینویچ قرار گرفته است. این استان از ۲۴ شهرستان تشکیل شده است که نمونه های مورد مطالعه از بیماران مشکوک به لیشمانیوز جلدی در شهرستان های شیراز، فیروزآباد، قیر و کارزین، فراشبند و لارستان جمع آوری شده اند (شکل ۱).

در این مطالعه که به صورت توصیفی - مقطعی و از خرداد تا مهرماه ۱۳۹۰ انجام شد، ابتدا اطلاعات مربوط به ۳۴ نفر از افراد مشکوک به لیشمانیوز جلدی از مراکز بهداشت و درمان شهرستان های مذکور دریافت و ضمن مراجعات حضوری به رسته های مختلف منطقه، از ضایعات پوستی و زخم هایی که مشکوک به سالک بود، نمونه برداری صورت گرفت. در مورد هر فرد، اطلاعات فردی، نوع زخم، مدت ابتلاء به زخم، تعداد ضایعات، محل ضایعه، سابقه مسافرت به مناطق اندمیک و سابقه مصرف دارو ثبت شد.

برای نمونه برداری، ابتدا سطح زخم با الکل ۷۰٪ ضد عفونی



شکل ۱: نقشه شهرستان های مورد مطالعه در استان فارس

Triton v/v ۱٪، Tris ۵۰ mM، NaCl ۱۰ mM، EDTA ۰.۱٪ با گسترش pH: 7.4 (pH: 7.4) بر روی هر گسترش ریخته و پس از جدا شدن گسترش، محتويات روی لام با استفاده از سمپلر به میکروتیوب ۱/۵ ml متنقل شد. پس از افزودن مقدار ۱۵ μl پروتئیناز k دوره بیستم، شماره چهارم، مهر و آبان ۱۳۹۱

جهت استخراج DNA از گسترش های تهیه شده بر روی لام و رنگ آمیزی شده با گیمسا، ابتدا لامها توسط اتانول ۹۶٪ شسته شدند تا روغن ایمرسیون باقیمانده بر روی لام پاک شود. بعد از خشک شدن لامها، مقدار ۱۰۰ μl بافر لیزکننده (M ۵۰ mM)

استخراج شده، ۵ میکرولیتر $X\text{-}1$ بافر، ۳ میکرولیتر MgCl_2 ، ۵ میکرولیتر dNTPs، ۰/۵ میکرولیتر Taq پلیمراز (Promega)، ۲۸/۵ میکرولیتر آب مقطر و ۲ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای Forward و Reverse و با استفاده از برنامه اختصاصی ترموسایکلر PCR برای ژن ITS انگل لیشمانیا انجام گردید. مرحله اول denaturation در دمای 95°C به مدت ۵ دقیقه و در ادامه ۳۱ سیکل متوالی شامل 94°C به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله annealing در دمای 60°C به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله extension در دمای برابر 72°C به مدت ۶۰ ثانیه و در پایان extension نهایی در دمای 72°C به مدت ۵ دقیقه انجام گردید. دو نمونه حاوی آب مقطر و DNA سویه‌های استاندارد لیشمانیا میجر و تروپیکا به ترتیب به عنوان شاهد منفی و مثبت در هر سری PCR استفاده شد. آمپلیکون‌ها توسط الکتروفورز در ژل آگارز $1/5$ ٪ حاوی اتیدیوم بروماید و با استفاده از مارکر 1kb مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج

گسترش‌های تهیه شده از ۳۴ بیمار در ۵ شهرستان مورد مطالعه استان فارس شامل شیراز (۶ بیمار)، فیروزآباد (۶ بیمار)، قیر و کازین (۵ بیمار)، فراشبند (۴ بیمار) و لارستان (۱۳ بیمار) مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۱).

(فرمنتاز) با غلظت 20 mg/ml به محلول فوق، به مدت ۴ تا ۶ ساعت در بن ماری 56°C قرار داده شد. بعد از خارج نمودن نمونه‌ها از بن ماری، در سه مرحله متوالی از $1\mu\text{l}$ فنول (سیناژن)، مخلوط هم حجم فنول - کلروفرم و کلروفرم طی مراحل جداگانه جهت شستشو استفاده و در هر مرحله پس از مخلوط کردن، در 10000 دور در دقیقه (rpm) و به مدت ۱۲ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از انتقال فاز رویی به میکروتیوب جدید، به میزان $1/10$ حجم محلول، استات سدیم 3 مولار و دو برابر حجم آن، اتانول سرد 96% به آن اضافه گردید و به مدت یک شب در فریزر 20°C -قرار داده شد. در نهایت با سانتریفیوژ نمونه و جدا کردن فاز رویی، رسوب DNA در $1\mu\text{l}$ از محلول TE1x حل شد (۲۶، ۲۷).

جهت تعیین ITS-rDNA در این مطالعه از ژن آلودگی لیشمانیایی در افراد مشکوک به بیماری در استان فارس استفاده شد. تکثیر ژن مورد نظر شامل قطعات ژنی ITS1 (Internal transcribed spacer 1)

ITS2 (Internal transcribed spacer 2)

و 5.8s با استفاده از دو پرایمر

LeishF ($5'\text{CAACACGCCGCCTCCTCTCT}'$) و LeishR ($5'\text{CCTCTCTTTTCNCTGTGC}'$)

PCR انجام گردید. استاندارد با حجم $50\text{ }\mu\text{l}$ میکرولیتر متشكل از 4 میکرولیتر DNA

جدول ۱: مشخصات و نتایج تشخیص میکروسکوپی بیماران مشکوک به لیشمانیوز جلدی مورد مطالعه در استان فارس

درجه مشاهده میکروسکوپی	تعداد نمونه	جنسيت بیمار	دست	پا	صورت	ضایعه	موارد بیش از یک
(۰) انگل در 1000 فیلد)	۵	۲	۳	۲			
(۱+) انگل در 1000 فیلد)	۹	۵	۳	۴			۱
(۲+) انگل در 100 فیلد)	۵	۳	۲	۱			۱
(۳+) انگل در 10 فیلد)	۸	*۵	۳	۴	*۱		۱
(۴+) انگل در هر فیلد)	۲	۱	۱	۱			۱
(۵+) انگل در هر فیلد)	۳	۱	۱	۱			۱
(۶+) انگل در هر فیلد)	۲	۱	۱	۱			۱
جمع	۳۴	۱۹	۱۵	۱۴	۱۷	۱	۵

*: شامل نمونه آلوده به لیشمانیا تروپیکا

متفاوت در میان گونه‌های مختلف لیشمانیا می‌شود. بر این اساس توالی حاصل از تکثیر این محدوده ژنی در لیشمانیا میجر اندازه‌ای حدود ۶۰۰ bp و در لیشمانیا تروپیکا حدود ۷۵۰-۸۰۰ bp دارد و بدین ترتیب این دو گونه انگل از یکدیگر متمایز می‌گردند (شکل ۲).

از این تعداد، پس از مشاهده میکروسکوپی، ۲۹ نمونه (٪۸۵) و با انجام PCR، آلدگی به انگل لیشمانیا در ۳۲ نمونه (٪۹۴) مثبت تشخیص داده شد. توالی تکثیر شده با استفاده از پرایمرهای LeishR و LeishF در این مطالعه، به دلیل دارابودن دگرگونی‌های درون ژنی، موجب ایجاد باندهایی با اندازه



شکل ۲: محصول ژن تکثیر شده ITS-rDNA لیشمانیا میجر و لیشمانیا تروپیکا جدا شده از بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی (M: مارکر، چاهک ۱: کنترل منفی، چاهک ۲: سویه استاندارد لیشمانیا میجر، چاهک ۳: لیشمانیا میجر جدا شده از بیمار جلدی، چاهک ۴: سویه استاندارد لیشمانیا تروپیکا، چاهک ۵: لیشمانیا تروپیکا جدا شده از بیمار جلدی)

ناشی از لیشمانیا میجر، بر روی پا و پس از آن بر روی دست بیماران بوده است.

بحث و نتیجه‌گیری

بیماری لیشمانیوز به عنوان یکی از مشکلات اصلی بهداشتی در استان فارس مطرح می‌باشد و موارد ابتلا به هر دو نوع بیماری (جلدی و احشایی) قابل توجه است. در این مطالعه، از بیماران مشکوک به لیشمانیوز در شهرستان‌های شیراز، فیروزآباد، قیر و کارزین، فراشبند و لارستان نمونه‌گیری به عمل آمد.

جهت تشخیص آلدگی لیشمانیایی در بیماران مشکوک و جداسازی انگل از روش تهیه گسترش مستقیم از ضایعه و

از ۳۲ نمونه‌ای که در آزمایش مولکولی آلدود به انگل لیشمانیا تشخیص داده شد، ۱ نمونه (٪۳)، گونه لیشمانیا تروپیکا و مابقی لیشمانیا میجر بودند. گونه لیشمانیا تروپیکا از بیمار پسر ۹ ساله ساکن روستای قیر در منطقه قیر و کارزین جدا و شناسایی شد. نتایج آزمایش PCR، ۳ نمونه از ۵ نمونه که در مشاهده میکروسکوپی صفر در نظر گرفته شده بودند، مثبت بود.

بیشترین تعداد ضایعه مشاهده شده در یک بیمار در این مطالعه، ۲ عدد بود. در مورد بیمار آلدود به لیشمانیا تروپیکا، ضایعه در قسمت پیشانی مشاهده شد. بیشترین تعداد ضایعه

و همکاران، Schörian و همکاران و Fryauff و همکاران با هدف قراردادن ژن ITS و تعیین توالی آن توانستند گونه‌های مختلف لیشمانیا را در نمونه‌های بالینی که به شکل گسترش یا بیوبسی تهیه شده بودند، شناسایی کنند(۳۱-۲۹). Kazemi-Rad و همکاران، Vaeznia و همکاران، Baghaei و همکاران و Mohammadi و همکاران نسبت به تشخیص و تمایز گونه‌های لیشمانیا در نمونه‌های بالینی تهیه شده به صورت گسترش مستقیم، استخراج شده از محیط کشت و نیز در گسترش‌های تهیه شده از جوندگان مخزن بیماری اقدام کردند(۳۲، ۲۶، ۲۷).

Mesgarian و همکاران و نیز Rahbarian و همکاران از قطعات ژنی ITS1 ۵.۸ و ITS2 ۳۴-۳۵ جهت شناسایی و تعیین گونه انگل لیشمانیا در بیماران مشکوک به لیشمانیوز در منطقه گبد کاووس استفاده کرده‌اند(۳۵-۳۴). پرایمرها و توالی مورد استفاده در این مطالعه، دقیقاً با پرایمرها و توالی مورد استفاده در مطالعه Mesgarian و همکاران یکسان بوده است(۳۴). با این تفاوت که اندازه قطعات حاصل از تکثیر ژن ITS در این مطالعه، اختلاف فاحشی با اندازه قطعات در مطالعه مذکور داشته است. بدین ترتیب که اندازه قطعات حاصل در این مطالعه برای لیشمانیا میجر و لیشمانیا تروپیکا به ترتیب حدود ۶۰۰ bp و ۷۵۰-۸۰۰ bp بوده است، در حالی که در نتایج مطالعه مذکور، اندازه قطعات برای گونه‌های لیشمانیا میجر و لیشمانیا تروپیکا به ترتیب حدود ۴۵۰-۴۰۰ bp و ۶۰۰-۷۰۰ bp گزارش شده است.

Rahbarian و همکاران با مطالعه موارد لیشمانیوز جلدی در بیماران منطقه گندکاووس و با استفاده از قطعه ژنی مذکور، اندازه قطعات را مشابه با نتایج مطالعه Mesgarian و همکاران برای لیشمانیا میجر و لیشمانیا تروپیکا ذکر کرده‌اند(۳۴، ۳۵). این در حالی است که توالی پرایمر reverse مطالعه مذکور با توالی پرایمر reverse مورد استفاده در پژوهش Mesgarian و همکاران، کاملاً متفاوت است(۳۴). لذا به نظر می‌رسد که طول قطعات ژن مورد مطالعه در Rahbarian و همکاران، با اندازه قطعات گزارش شده در مطالعه Mesgarian و همکاران به دلیل

مشاهده میکروسکوپی استفاده شد. استفاده از گسترش‌های تهیه شده از ضایعات فعال جهت آزمایشات مولکولی دارای مزایایی است که از آن جمله می‌توان به امکان تشخیص سریع، سهولت در نمونه‌گیری و انتقال به آزمایشگاه، استفاده از یک نمونه جهت آزمایش توأم میکروسکوپی و مولکولی و نیز امکان استفاده از گسترش‌های قدیمی اشاره کرد. همچنین از مهم‌ترین مزایای آزمایش مولکولی بر پایه گسترش مستقیم، امکان تعیین هویت تمام گونه‌ها یا سویه‌های موجود در یک نمونه است.

برخی از ژن‌های ژنوم اندامک‌هایی مثل میتوکندری، کینتوفلاست و هسته از قبیل ژن‌های هیستون‌ها و DNA ریبوزومی (rDNA)، هدف‌های مناسبی جهت تشخیص گونه‌های انگل لیشمانیا می‌باشند(۲۸، ۱۹).

ساختار و توالی قسمت‌هایی از rDNA بسیار ثابت و پایدار بوده و از این رو ابزاری مناسب برای مطالعات تنوع ژنتیکی است و در میان گونه‌های بسیار نزدیک نیز دارای تنوع می‌باشد(۲۰).

بخشی از توالی DNA ریبوزومی شامل ژن‌های ۱۸s rDNA، ۲۸s rDNA، ژن ITS1، ژن ITS2، ۵.۸s rDNA و ژن ناحیه ITS2 از این رو اهمیت می‌باشد. 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 پلی‌مورفیسم حاصله می‌تواند کمک شایانی جهت شناسایی جنس‌ها و حتی گونه‌های مختلف باشد که با روش‌های متنوعی قابل اجراست.

پرایمرهای به کار رفته در این مطالعه، نواحی ITS1، ۵.۸s و ITS2 را تکثیر می‌کند. این بخش از ژنوم ریبوزومی انگل، به دلیل دارابودن دگرگونی‌های درون ژنی، موجب ایجاد باندهایی با اندازه متفاوت در میان گونه‌های مختلف لیشمانیا می‌شود. بر این اساس توالی حاصل از تکثیر این محدوده ژنی در لیشمانیا میجر اندازه‌ای حدود ۶۰۰ bp و در لیشمانیا تروپیکا حدود ۷۵۰-۸۰۰ bp دارد و بدین ترتیب این دو گونه انگل از یکدیگر متمایز می‌گردند.

لذا با توجه به نوع پرایمر و توالی مورد استفاده در این مطالعه جهت افتراق گونه‌های عامل بیماری لیشمانیوز جلدی در کانون استان فارس، یافتن روشی کاربردی که دارای حساسیت و کارایی بالا بوده و افزون بر دقت بالا، امکان تشخیص سریع‌تر را فراهم نماید، ضروری می‌باشد. به ویژه در مراکز تحقیقاتی و درمانی کانون‌های اندمیک بیماری که دارای تعداد بالای مراجعان و بیماران بوده و لذا دو عامل مهم دقت و سرعت، دارای اهمیت بسیاری است.

سپاسگزاری

نویسنده‌گان مقاله از زحمات مسئولین دانشگاه علوم پزشکی فارس و شبکه‌های بهداشت و درمان شهرستان‌های مورد مطالعه قدردانی می‌نمایند.

تفاوت توالی پرایمر reverse در مطالعات مذکور، یکسان نبوده و دارای تناقض باشد(۳۵,۳۶).

با توجه به نتایج این مطالعه لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا میجر به عنوان عامل بیماری لیشمانیوز جلدی در مناطق مورد مطالعه در استان فارس تشخیص داده شده و تأیید شد. این نخستین پژوهش جهت تعیین عامل بیماری لیشمانیوز جلدی در بیماران مناطق قیر و کارزین، فیروزآباد، فراشبند و لارستان بوده است و برای اولین بار آنلودگی انسانی به انگل لیشمانیا تروپیکا در منطقه قیر و کارزین گزارش می‌گردد.

نظر به نتایج حاصله در این مطالعه، محدودیت‌هایی نیز مانند محدودیت در پوشش دادن کل روستاهای منطقه مورد مطالعه و نیز تعداد نمونه‌های مورد بررسی نیز در روند این تحقیق وجود داشت.

References:

- 1— Cupolillo E, Grimaldi JRG, Momen H, Beverly SM. *Intergenic region typing(IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of Leishmania*. Mol Biochem Parasitol 1995; 73(1-2): 145-55.
- 2— 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): 63-78.
- 3— Dowlati Y, Firooz A. *Leishmaniasis (letter)*. J Am Acad Dermatol 1997; 37(1): 139-40.
- 4— Tashakori M, Kuhls K, Al_Jawabreh A, Mauricio I, Schönian G, Farajnia S, et al. *Leishmania major: genetic heterogeneity of Iranian isolates by single-strand conformation polymorphism and sequence analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer*. Acta Trop 2006; 98(1): 52-58.
- 5— Nadim A, Tahvildar_Bidruni Gh, Farshian M, Heydari M, Abadi AA. *Differentiation of Leishmania tropica major from Leishmania tropica minor by inoculation to laboratory animals*. Iranian J Publ Health 1973; 2(2): 115-18.
- 6— Moin_Vaziri V, Depaquit J, Yaghoobi_Ershadi MR, Oshaghi MA, Derakhshandeh_Peykar P, Ferté H, et al. *Intraspecific variation within Phlebotomus sergenti Parrot (1917) (Diptera: Psychodidae) based on mtDNA sequences in Islamic Republic of Iran*. Acta Trop 2007; 102(1): 29-37.
- 7— Nadim A, Seyedi_Rashti MA. *A brief review of the epidemiology of various types of leishmaniasis in Iran*. Acta Med Iran 1971; 14(2): 99-106.
- 8— Mohebali M, Javadian E, Yaghoobi-Ershadi MR, Akhavan AA, Hajjaran H, Abaei MR. *Characterization of*

- Leishmania infection in rodents from endemic areas of the Islamic Republic of Iran.* East Mediterr Health J 2004; 10(4-5): 591-9.
- 9- Javadian E, Dehestani M, Nadim A, Rassi Y, Tahvildare-Bidruni GH, Seyed-Rashti MA, et al. *Confirmation of Tatera indica (Rodentia: Gerbillidae) as the main reservoir host of zoonotic cutaneous leishmaniasis in the west of Iran.* Iranian J Publ Health 1998; 27(2): 55-60.
- 10- Nekouie H, Assmar M, Razavi MR, Naddaf SR. *A study on Leishmania infection rate among Phlebotomus spp. collected from Abardejh district, Iran.* Iran J Vet Res 2006; 7(4): 77-81.
- 11- Iran Ministry of Health & Medical Education (IMHME). *Official report of leishmania cases in Iran.* 2010.
- 12- Lainson R, Shaw JJ. *Evolution, classification and geographical distribution.* In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. The Leishmaniasis in biology and medicine. Orlando: Academic Press; 1987.p. 120-8.
- 13- Pearson RD, De Queiroz Sousa A, Jeronimo SMB. *Leishmania species: visceral (Kala-Azar), cutaneous and mucosal leishmaniasis.* In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Principles and practice of infectious diseases. New York: Churchill Livingstone; 2001.p. 283-45.
- 14- Sidney NK, Shoshana F, Arieh I. *Epidemiology of cutaneous leishmaniasis.* Clin Dermatol 1999; 17(3): 257-60.
- 15- el Tai NO, Osman OF, el Fari M, Presber W, Schönian G. *Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer (ITS) in clinical samples of Leishmania donovani spotted on filter paper as revealed by single strand conformation polymorphisms (SSCP) and sequencing.* Trans R Soc Trop Med Hyg 2000; 94(5): 575-9.
- 16- Wislon SM. *DNA-based methods in the detection of Leishmania parasite: field applications and practicalities.* Ann Trop Med Parasitol 1995; 89(Suppl 1): 95-100.
- 17- van Eys GJ, Schoone GJ, Kroon NC, Ebeling SB. *Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of Leishmania parasites.* Mol Biochem Parasit 1992; 51(1): 133-42.
- 18- Eisenberger CL, Jaffe CL. *Leishmania: identification of Old World species using a permissively primed intergenic polymorphic polymerase chain reaction.* Exp Parasitol 1999; 91(1): 70-7.
- 19- Luis L, Ramirez A, Aguilar CM, Eresh S, Barker DC, Mendoza-Leon A. *The genomic fingerprinting of the coding region of the β-tubulin gene in Leishmania identification.* Acta Trop 1998; 69(3): 193-204.
- 20- Victoir K, Banuls AL, Arevalo J, Llanos-Cuentas A, Hamers R, Noel S, et al. *The gp63 gene locus, a target for genetic characterization of Leishmania belonging to subgenus Viannia.* Parasitology 1998; 117(1): 1-13.
- 21- Russell R, Iribar MP, Lambson B, Brewster S, Blackwell JM, Dye C, et al. *Intra and inter-specific microsatellite variation in the Leishmania subgenus Viannia.* Mol Biochem Parasit 1999; 103(1): 71-7.
- 22- De Bruijn MH, Barker DC. *Diagnosis of New World Leishmaniasis: specific detection of species of the Leishmania braziliensis complex by amplification of kinetoplast DNA.* Acta Trop 1992; 52(1): 45-58.
- 23- Marfurt J, Niederwieser I, Makia ND, Beck P, Felger I. *Diagnostic genotyping of old and new world*

- Leishmania species by PCR-RFLP.* Parasitology 2003; 46(2): 115_24.
- 24— Hatam GR, Ardehali S, Motazedian MH, Sadjjadi SM, Fakoorziba MR. *The methods of isolation and characterization of Leishmania parasite.* Shiraz: Shiraz University of Medical Sciences; 2005.p. 15_20. [Persian]
- 25— Worth Health Organization. *Basic laboratory methods in medical parasitology.* Geneva: WHO; 1991.
- 26— Kazemi_Rad E, Mohebali M, Hajjaran H, Rezaei S, Mamishi S. *Diagnosis and characterization of leishmania species in giemsa-stained slides by PCR-RFLP.* Iran J Publ Health 2008; 37(1): 54_60.
- 27— Baghaei A, Parvizi P, Amirkhani A, Honarvar MR, Badiei F. *Identification of leishmania using microscopic and molecular methods in suspected patients of cutaneous leishmaniasis by targeting ITS-rDNA gene in Golestan province, Iran(2009-10).* J Gorgan Uni Med Sci 2012; 14(3): 72-81. [Persian]
- 28— Valizadh M, Dalimi A, Jafary M, Khamesi_pour A, Mohajeri M. *Determination of Leishmania species causing cutaneous leishmaniasis in Mashhad by ELISA using specific monoclonal antibodies.* Modares J Med Sci 2004; 7(2): 107_13. [Persian]
- 29— 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.* Diagn Microbiol Infect Dis 2003; 47(1): 349_58.
- 30— Fryauff JD, Hanafi AH, Klena JD, Hoel DF, Appawu M, Rogers W, et al. *Short report: ITS-1 DNA sequence confirmation of Leishmania major as a cause of cutaneous leishmaniasis from an outbreak focus in the Ho district, Southeastern Ghana.* Am J Trop Med Hyg 2006; 75(3): 502_4.
- 31— 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.* Exp Parasitol 2007; 115(4): 339_43.
- 32— Vaeznia H, Dalimi A, Sadraei J, Pirstani M. *Determination of Leishmania species causing cutaneous leishmaniasis in Mashhad by PCR-RFLP method.* Arch Razi Inst 2009; 64(1): 39_44. [Persian]
- 33— Mohammadi Azani S, Rassi Y, Oshaghi MA, Yaghoubi-Ershadi MR, Mohebali M, Abaei MR, et al. *Diagnosis and characterization of Leishmania species in patients and rodents Giemsa-stained slides by PCR-RFLP in Damghan district, Iran.* Sci J Hamadan Univ Med Sci 2011; 17(4): 5_9. [Persian]
- 34— Mesgarian F, Rahbarian N, Mahmoudi Rad M, Hajaran H, Shahbaz F, Mesgarian Z, et al. *Identification of Leishmania species isolated from human cutaneous Leishmaniasis in Gonbad-e-Qabus city using a PCR method during 2006-2007.* Tehran Univ Med J 2010; 68 (4): 872_7. [Persian]
- 35— Rahbarian N, Mesgarian A, Mahmoudi Rad M, Hajaran H, Shahbazi F, Mesgarian Z, et al. *Identification of leishmania species isolated from human cutaneous leishmaniasis using PCR Method.* J Res Health Sci 2009; 9(2): 48_51.

Microscopic and Molecular Detection of Leishmania Species Among Suspected Patients of Cutaneous Leishmaniasis Using ITS-r DNA in Fars Province

Baghaei A(MSc)¹, Jasbi E(MSc)², Akhouni M(PhD)^{*3}, Mirzaei H(MSc)⁴, Dehnam O(Bsc)⁵

^{1,2}*Department of Microbiology, Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, Iran*

³*Department of Parasitology, Reims University, Reims, France*

⁴*Department of Microbiology, Islamic Azad University, Lahijan Branch, Lahijan, Iran*

⁵*Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran*

Received: 6 Nov 2011

Accepted: 29 Jun 2012

Abstract

Introduction: Fars province is one of the most important foci of leishmaniasis that includes two types of cutaneous (urban and rural forms) and visceral leishmaniasis in sympatry. To study leishmaniasis among suspected patients of cutaneous leishmaniasis in 5 counties of Shiraz, Firouz abad, Ghir-Karzin, Farashband and Larestan, both microscopic and molecular analysis were carried out in the present study.

Methods: The samples were smeared on the microscopic slides and were also stained by Giemsa. All smears were examined under a light microscope and the positive smears were scored for amastigote frequency. DNA was extracted from stained smears and Leishmania DNA was detected by amplification of ITS1-5.8s-ITS2 fragments. Amplicons were analyzed using electrophoresis in 1.5% agarose gel containing ethidium bromide.

Results: Among 34 studied patients, 29 cases (85%) were positive in microscopic and 32 (94%) in molecular analysis using standard PCR. All examined samples were infected with *L.major* except one (3%) that was infected with *L.tropica*. Most lesions due to *L.major* were located on the feet, whereas ulcer due to *L.tropica* was on the forehead.

Conclusions: Preparing stained smears from active lesions of suspected patients (microscopic analysis) removes the problem of Leishmania preservation and transition to culture media. Also, intergenic variations in amplified fragment of ITS-rDNA cause to produce fragments with different length and based on this difference, we can identify *L. major* and *L. tropica* separately. Using microscopic and molecular methods in present study confirmed presence of *L.major* and *L.tropica* as the causative agents of CL in studied regions of Fars.

Keywords: Cutaneous Leishmaniasis; Leishmania major; *L. Tropica*; ITS-rDNA; Fars & Iran

This paper should be cited as:

Baghaei A, Jasbi E, Akhouni M, Mirzaei H, Dehnam O. ***Microscopic and molecular detection of Leishmania species among suspected patients of cutaneous leishmaniasis using ITS-r DNA in Fars province.*** J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2012; 20(4): 464-73.

****Corresponding author: Tel: +33 6 97 00 02 07, Email: m.akhoundi@yahoo.com***