مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۰ ، شماره ۴، مهر و آبان ۱۳۹۱
صفحه: ۴۷۳-۴۶۴

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 20, No. 4, Sep- Oct 2012
Pages: 464-473

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 میرزایی[۴]، امید دهنام[۵]

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

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۸/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۴/۸

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 شیراز، فیروزآباد، قیر و کارزین، فراشبند و لارستان و جهت تعیین گونه انگل، از روش‌های میکروسکوپی و مولکولی توأماً استفاده شد.

روش بررسی: پس از تهیه گسترش از ضایعه فعال بیمار و رنگ‌آمیزی گیمسا، آماستیگوت‌های انگل با استفاده از میکروسکوپ نوری مشاهده و گسترش‌ها براساس فراوانی انگل درجه‌بندی 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 (سنجش میکروسکوپی)، نیاز به حفظ و انتقال انگل به محیط کشت را مرتفع می‌سازد. ضمناً توالی تکثیر شده در این مطالعه، به دلیل دارابودن 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

*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۰۳۳۶۷۹۰۰۰۲۰۷، پست الکترونیکی: m.akhoundi@yahoo.com

www.SID.ir

مقدمه

لیشمانیوز یکی از ۶ بیماری مهم گرمسیری می‌باشد که به اشکال جلدی (سالک)، احشایی (کالاآزار) و جلدی ـ مخاطی ظاهر می‌شود. این بیماری در ۸۸ کشور جهان در قاره‌های آسیا، اروپا، آفریقا و آمریکا دیده می‌شود(۱،۲). لیشمانیوز جلدی به‌عنوان یکی از مشکلات عمده 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، برزیل، ایران، پرو، عربستان سعودی، سوریه، الجزایر و سودان) رخ می‌دهد(۴ـ۲).

در ایران، لیشمانیوز جلدی (ZCL) ناشی از لیشمانیا میجر (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) معضل 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 ترکمن‌صحرا و لطف‌آباد در شمال شرق ایران، ابردژ ورامین، اصفهان و یزد در مرکز ایران، فارس و سیستان ـ 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 دو 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، 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 اسلایدهای رنگ‌آمیزی شده با گیمسا از زخم بیمار و مشاهده میکروسکوپی آماستیگوت 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 علائم بالینی، اپیدمیولوژی بیماری، بررسی ناقلین، 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)، مایکروستلایت DNA(۲۱) و DNA 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

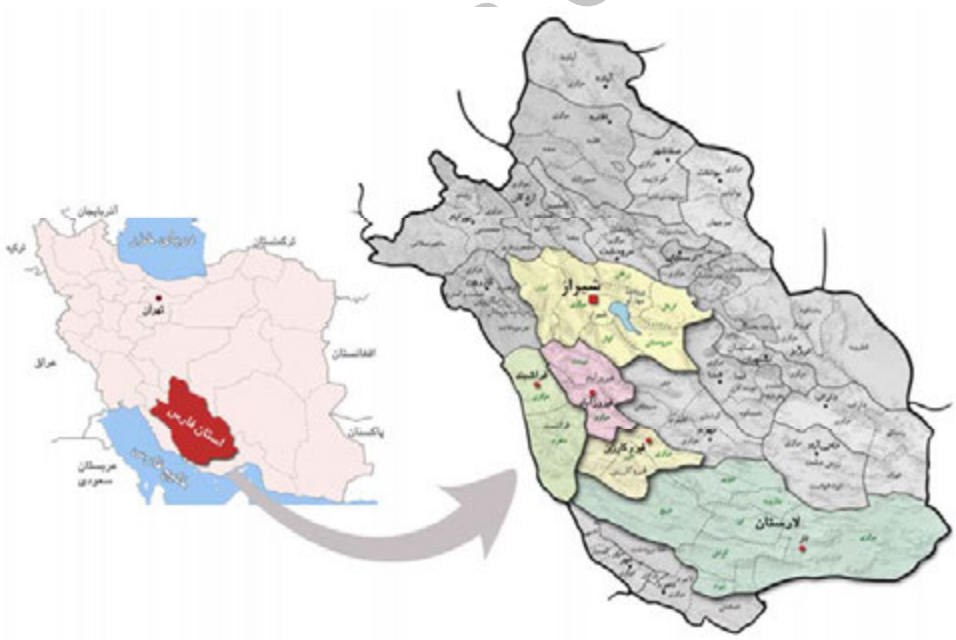
Archive of SID
www.SID.ir

دقیقه و ۳۱ درجه و ۴۲ دقیقه عرض شمالی و ۵۰ درجه و ۴۲ دقیقه و ۵۵ درجه و ۳۶ دقیقه طول خاوری از نیمروز گرینویچ قرارگرفته است. این استان از ۲۴ شهرستان تشکیل شده است که نمونه‌های مورد مطالعه از بیماران مشکوک به لیشمانیوز جلدی در شهرستان‌های شیراز، فیروزآباد، قیر و کارزین، فراشبند و لارستان جمع‌آوری شده‌اند (شکل ۱).

در این مطالعه که به صورت توصیفی ـ 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 شهرستان‌های مذکور دریافت و ضمن مراجعات حضوری به روستاهای مختلف منطقه، از ضایعات پوستی و زخم‌هایی که مشکوک به سالک بود، نمونه‌برداری صورت گرفت. در مورد هر فرد، اطلاعات فردی، نوع زخم، مدت ابتلا به زخم، تعداد ضایعات، محل ضایعه، سابقه مسافرت به مناطق اندمیک و سابقه مصرف دارو ثبت شد.

برای نمونه‌برداری، ابتدا سطح زخم با الکل ۷۰٪ ضدعفونی شد. چنانچه زخم پوشیده از عفونت باکتریایی یا قارچی بود، قسمت مورد نظر برای نمونه‌برداری از ضایعات عفونی پاک می‌شد. به کمک لنست یکبار مصرف استریل، از لبه و حاشیه زخم در جهت مرکز به حاشیه شکافی در زیر ناحیه متورم ایجاد، سپس مقداری از سروزیته توسط لنست به سطح لام منتقل گردید و به خوبی پخش شد(۲۴). نمونه‌برداری طوری انجام شد که حتی‌المقدور در نمونه خون وارد نگردد. بلافاصله نام و شماره بیمار در کنار لام نوشته می‌شد.

برای مشاهده میکروسکوپی و درجه‌بندی لام‌های رنگ‌آمیزی شده، اسمیرهای تهیه شده از ضایعات بیمار با متانول ۹۵٪ به مدت ۳۰ ثانیه فیکس گردیدند و سپس با رنگ گیمسا (رقت ۱:۱۰ با آب مقطر) به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. پس از رنگ‌آمیزی، لام‌ها با آب شسته شده و بعد از خشک شدن، آماستیگوت‌های انگل روی لام در زیر میکروسکوپ نوری با روغن ایمرسیون و درشت نمایی ۱۰۰۰x جستجو شد. لام‌ها بر اساس فراوانی انگل از +۱ تا +۶ درجه بندی شدند(۲۵).



شکل ۱: نقشه شهرستان‌های مورد مطالعه در استان فارس

جهت استخراج DNA از گسترش‌های تهیه شده بر روی لام و رنگ‌آمیزی 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 ۳۰۰µl بافر لیزکننده (۵۰mM NaCl، ۵۰mM Tris، ۱۰mM EDTA، ۱٪ Triton v/v با pH: 7.4) بر روی هر گسترش ریخته و پس از جداشدن گسترش، محتویات روی لام با استفاده از سمپلر به میکروتیوب ۱/۵ml منتقل شد. پس از افزودن مقدار ۱۵ µl پروتئیناز k

www.SID.ir
Archive of SID

(فرمنتاز) با غلظت ۲۰mg/ml به محلول فوق، به مدت ۴ تا ۶ ساعت در بن ماری ۵۶°C قرار داده شد. بعد از خارج نمودن نمونه‌ها از بن ماری، در سه مرحله متوالی از µl ۳۰۰ فنول (سیناژن)، مخلوط هم حجم فنول ـ کلروفرم و کلروفرم طی مراحل جداگانه جهت شستشو استفاده و در هر مرحله پس از مخلوط کردن، در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) و به مدت ۱۲ دقیقه سانتریفوژ شد. پس از انتقال فاز رویی به میکروتیوب جدید، به میزان ۰/۱ حجم محلول، استات سدیم ۳ مولار و دو برابر حجم آن، اتانول سرد ۹۶٪ به آن اضافه گردید و به مدت یک شب در فریزر ۲۰°C- قرار داده شد. در نهایت با سانتریفوژ نمونه و جدا کردن فاز رویی، رسوب DNA در µl ۳۰ از محلول TE1x حل شد(۲۶،۲۷).

جهت تعیین ITS-rDNAدر 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'CAACACGCCGCCTCCTCTCT3′) و LeishR (5'CCTCTCTTTTTTCNCTGTGC3′) انجام گردید. PCR استاندارد با حجم ۵۰ میکرولیتر متشکل از ۴ میکرولیتر DNA استخراج شده، ۵ میکرولیتر ۱۰Xبافر، ۳ میکرولیتر MgCl2، 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 ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه و در ادامه ۳۱ سیکل متوالی شامل ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله annealing در دمای ۶۰°C به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله extension در دمایی برابر ۷۲°C به مدت ۶۰ ثانیه و در پایان extension نهایی در دمای ۷۲°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 ۱/۵٪ حاوی اتیدیوم بروماید و با استفاده از مارکر ۱kb 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 کارزین (۵ بیمار)، فراشبند (۴ بیمار) و لارستان (۱۳ بیمار) مورد بررسی قرار گرفتند(جدول ۱).

جدول۱: مشخصات و نتایج تشخیص میکروسکوپی بیماران مشکوک به لیشمانیوز جلدی مورد مطالعه در استان فارس

درجه مشاهده میکروسکوپی	تعداد نمونه	جنسیت بیمار		محل ضایعه			موارد بیش از یک ضایعه
		مرد	زن	دست	پا	صورت	تنه
۰ (۰ انگل در ۱۰۰۰ فیلد)	۵	۲	۳	۲	۳		
+۱ (۱۰-۱ انگل در ۱۰۰۰ فیلد)	۹	۵	۴	۳	۵		۱
+۲ (۱-۰ انگل در ۱۰۰ فیلد)	۵	۳	۲	۲	۳		۱ دست ـ دست
+۳ (۱۰-۱ انگل در ۱۰ فیلد)	۸	۵ *	۳	۴	۲	۱ *	۱
+۴ (۱۰ـ۱ انگل در هر فیلد)	۲	۱	۱	۱	۲		دست ـ پا
+۵ (۱۰۰-۱۰ انگل در هر فیلد)	۳	۲	۱	۱	۲		۱ دست ـ پا
+۶ (۱۰۰۰-۱۰۰ انگل در هر فیلد)	۲	۱	۱	۱			۱
جمع	۳۴	۱۹	۱۵	۱۴	۱۷	۱	۵

* : شامل نمونه آلوده به لیشمانیا تروپیکا

Archive of SID

www.SID.ir

از این تعداد، پس از مشاهده میکروسکوپی، ۲۹ نمونه (۸۵٪) و با انجام PCR، آلودگی به انگل لیشمانیا در ۳۲ نمونه (۹۴٪) مثبت تشخیص داده شد. توالی تکثیر شده با استفاده از پرایمرهای LeishF و LeishR در این مطالعه، 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 (شکل ۲).

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، چاهک۳: لیشمانیا میجر جدا شده از بیمار جلدی، چاهک۴: سویه استاندارد لیشمانیا تروپیکا، چاهک ۵: لیشمانیا تروپیکا جدا شده از بیمار جلدی)

از ۳۲ نمونه‌ای که در آزمایش مولکولی آلوده 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 آلوده به لیشمانیا تروپیکا، ضایعه در قسمت پیشانی مشاهده شد. بیشترین تعداد ضایعه 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 آلودگی لیشمانیایی در بیماران مشکوک و جداسازی انگل از روش تهیه گسترش مستقیم از ضایعه و

www.SID.ir

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، کینتوپلاست و هسته از قبیل ژن‌های هیستون‌ها و DNA ریبوزومی (rDNA)، هدف‌های مناسبی جهت تشخیص گونه‌های انگل لیشمانیا می‌باشند(۱۹،۲۸).

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 18s rDNA، ناحیه ITS1، ژن 5.8s rDNA، ناحیه ITS2 و ژن 28s rDNA 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. بدین‌ترتیب 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، 5.8s 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 ترواپیکا حدود ۷۵۰ـ۸۰۰ bp دارد و بدین ترتیب این دو گونه انگل از یکدیگر متمایز می‌گردند.

Schönian و همکاران، Fryauff و همکاران و Gadisa و همکاران با هدف قراردادن ژن ITS و تعیین توالی آن توانستند گونه‌های مختلف لیشمانیا را در نمونه‌های بالینی که به شکل گسترش یا بیوپسی 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(۲۷،۲۶،۳۲،۳۳).

Mesgarian و همکاران و نیز Rahbarian و همکاران از قطعات ژنی ITS1 ,5.8 و ITS2 جهت شناسایی و تعیین گونه انگل لیشمانیا در بیماران مشکوک به لیشمانیوز در منطقه گنبد 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 ترواپیکا به ترتیب حدود ۶۰۰bp و ۷۵۰-۸۰۰bp بوده است، در حالی که در نتایج مطالعه مذکور، اندازه قطعات برای گونه‌های لیشمانیا میجر و لیشمانیا ترواپیکا به ترتیب حدود ۶۰۰-۷۰۰bp و ۴۰۰-۴۵۰bp گزارش شده است.

Rahbarian و همکاران با مطالعه موارد لیشمانیوز جلدی در بیماران منطقه گنبدکاووس و با استفاده از قطعه ژنی مذکور، اندازه قطعات را مشابه با نتایج مطالعه Mesgarian و همکاران برای لیشمانیا میجر و لیشمانیا ترواپیکا ذکر کرده‌اند(۳۵،۳۴). این درحالی 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

Archive of SID

www.SID.ir

تفاوت توالی پرایمر reverse در مطالعات مذکور، یکسان نبوده و دارای تناقض باشد(۳۵،۳۴).

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 آلودگی 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.

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

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

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***

Archive of SID

www.SID.ir

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, Seyedi_Rashti MA, et al. ***Confirmation of Tatera indica (Rodentia: Gerbilidae) 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 Dermathol 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***

Archive of SID

www.SID.ir

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.

Archive of SID

www.SID.ir

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], Akhoundi 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, Akhoundi 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***

Archive of SID

ir