Archive of SID

مقاله پژوهشی

شناسایی گونه‌های انگل لیشمانیای جدا شده از بیماران مبتلا به کالاآزار به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز یک‌مرحله‌ای

نویسندگان:

مهدی فخار[*۲،۱]، محمد حسین معتضدیان[۳]، سید علی هاشمی[۴]، احمد گلکار[۵]

۱- بخش انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲- مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳- بخش انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ایران

۴- بخش پاتولوژی دانشکده پزشکی، بیمارستان شهید مطهری جهرم، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، ایران

۵- بخش پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، ایران

فصلنامه دانشگاه علوم پزشکی جهرم، دوره نهم، شماره دو ، تابستان ۹۰

چکیده:

مقدمه: لیشمانیوز احشایی (کالاآزار) بیماری انگلی مهمی است که توسط گونه‌های لیشمانیای دونوانی و اینفانتوم ایجاد می شود. شواهد اپیدمیولوژی نشان می دهد که لیشمانیوز احشایی در بعضی از مناطق شهرستان جهرم از استان فارس شایع است. مطالعه حاضر با هدف تعیین هویت عامل ایجاد کننده لیشمانیوز احشایی در این شهرستان انجام شد.

روش کار: در این مطالعه تجربی از ۱۶ نفر بیمار مبتلا به کالاآزار بستری شده در بیمارستان شهید مطهری جهرم در طی سال های ۱۳۷۷ تا ۱۳۸۳ نمونه مغز استخوان گرفته شد. دی ان آ از اسلایدهای میکروسکوپی تهیه شده از این نمونه ها استخراج و گونه انگل با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) اختصاصی تعیین شد. برای این کار با استفاده از پرایمر $LINR_4$ و LIN_{17} قطعه متغیر از حلقه های کوچک دی ان آی کینتوپلاستی انگل لیشمانیا تکثیر و روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد.

یافته ها: تمامی بیماران از نظر سرولوژی با استفاده از آزمون ایمونوفلوروسنت غیرمستقیم مثبت بودند. در بررسی اسمیرهای مستقیم مغز استخوان، آماستیگوت‌های انگل (اجسام لیشمن) به تعداد زیاد مشاهده شد. تمامی نمونه ها در آزمایش واکنش زنجیره ای پلی مراز باندی به اندازه ۷۲۰ جفت باز ایجاد کردند. مقایسه این باندها با باندهای گونه های استاندارد، مشخص نمود که گونه انگل در تمامی بیماران لیشمانیا اینفانتوم است.

بحث و نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که تعیین گونه با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلی مراز یک مرحله ای و پرایمرهای $LINR_4$ و LIN_{17} روشی ساده و سریع است. همچنین عامل لیشمانیوز احشایی در بیماران تحت بررسی لیشمانیا اینفانتوم می باشد.

واژگان کلیدی: لیشمانیوز احشایی، کالاآزار، لیشمانیا اینفانتوم، واکنش زنجیره‌ای پلی مراز، مغز استخوان

مقدمه:

لیشمانیازیس که توسط گونه های مختلف انگل لیشمانیا ایجاد می شود، طیف وسیعی از بیماری‌ها از ضایعه جلدی تا لیشمانیوز احشایی کشنده را در بر می گیرد. تظاهرات بالینی بیماری به سه شکل جلدی، جلدی مخاطی و احشایی می باشد. لیشمانیوز احشایی فرم سیستمیک بیماری است که با نام کالاآزار معروف می باشد و به وسیله گونه های لیشمانیا دونوانی و اینفانتوم ایجاد می شود. لیشمانیوز احشایی در بیش تر مناطق ایران به صورت اسپورادیک (تک گیر) و در مناطقی از استان های اردبیل (مشکین شهر و دشت مغان)، آذربایجان شرقی (اهر و کلیبر)، فارس (فیروز آباد، جهرم، نور آباد و داراب)، بوشهر (برازجان و خورموج) و قم (بخش خلجستان) به صورت آندمیک دیده می شود [۱ و ۲]. مخازن بیماری، سگ و سگ سانان (روباه و شغال) و ناقلین آن، گونه های مختلف پشه خاکی هستند. در

* نویسنده مسئول، آدرس: ساری، کیلومتر ۱۸ جاده خزر آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم (ص)، دانشکده پزشکی، صندوق پستی: ۱۶۶۵-۴۸۱۷۵

تلفن تماس: ۰۹۱۲۲۵۲۲۷۸۲ پست الکترونیک: mahdif53@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۰۸/۰۵ تاریخ اصلاح: ۱۳۸۹/۱۲/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۱/۲۲

www.SID.ir

Archive of SID

ایران این بیماری اغلب در کودکان زیر ده سال (۹۸ درصد) دیده می شود و بیش تر بین روستاییان و به ویژه عشایر استان‌های مختلف کشور شایع است. مواردی از کالاآزار همراه با لیشمانیوز پوستی منتشر از جنوب ایران (استان فارس) گزارش شده است که عامل آن لیشمانیا تروپیکا بوده است [۱-۴].

حقیقت و خلق ا... در سال ۱۳۶۶، تعداد بیماران شهرستان جهرم طی شش ماه دوم سال را ۵۲ مورد با بیش ترین فراوانی مربوط به اطفال زیر دو سال گزارش نمودند [۵]. در سال ۱۳۶۹، ادریسیان و همکاران با انجام آزمایشات سرولوژی و انگل شناسی در کانون های فیروزآباد و جهرم نشان دادند که سگ، شغال و روباه دارای میزان بالایی از عفونت هستند [۶].

شواهد اپیدمیولوژیک نشان می دهد که لیشمانیوز احشایی در بعضی از مناطق شهرستان جهرم شایع است. از آن جائی که تا کنون مطالعه ای در خصوص تعیین عوامل ایجاد کننده این بیماری در این شهرستان به عنوان یکی از کانون های مهم بیماری در ایران انجام نشده است و به علاوه شناسایی گونه های مختلف انگل، نقش موثری در اپیدمیولوژی مولکولی و ارائه راهکارهای مناسب در راستای کنترل بیماری در منطقه خواهد داشت، لذا برای اولین بار از طریق مطالعه حاضر، هویت انگل های لیشمانیای جدا شده از بیماران مبتلا به کالاآزار این شهرستان به کمک روش واکنش زنجیره ای پلی مراز یک مرحله ای تعیین شدند.

روش کار:

در این مطالعه تجربی، ۱۶ بیمار مبتلا به کالاآزار مراجعه کننده به بیمارستان شهید مطهری در سال های ۱۳۷۷ تا ۱۳۸۳، توسط پزشک متخصص کودکان مورد معاینات بالینی قرار گرفتند که به منظور تأیید این بیماری، سونوگرافی شکم، آزمایش‌های شمارش کامل سلولهای خونی، ادرار و سرولوژی درخواست شد. همچنین برای تأیید نهایی، آسپیراسیون مغز استخوان نیز انجام شد. اسمیرهای مستقیم مغز استخوان پس از ثابت نمودن با الکل متیلیک، با رنگ گیمسا رنگ آمیزی شدند. از ۱۶ بیمار مورد مطالعه با میانگین گروه سنی ۱۴ ماه ، ۷ بیمار مرد و بقیه زن و همگی ساکن روستاهای اطراف شهرستان جهرم بودند.

برای استخراج دی ان آ از اسلایدهای رنگ آمیزی شده مغز استخوان بیماران و برای تعیین گونه انگل از روش وینسی و همکاران استفاده شد [۷]. روی دی ان آی استخراج شده، آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز اختصاصی گونه انجام گرفت. برای این منظور با استفاده از پرایمر $LINR_4$ و LIN_{17} قطعه متغیر از حلقه های کوچک دی ان آی کینتوپلاستی انگل لیشمانیا در یک مرحله تکثیر شد [۸]. مواد لازم برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در نمونه ای به حجم ۲۵ میکرولیتر عبارت بود از: تک دی ان آ پلی‌مراز (سیناژن، ایران) ۱/۵ واحد، بازهای دی اکسی نوکلئوتید ۲۵۰ میلی مول، کلرید منیزیم ۲ میلی مول، بافر واکنش زنجیره ای پلی‌مراز (سیناژن، ایران) ۲/۵ میکرولیتر، ۱/۶ میکرومول از پرایمرهای $LINR_4$ (GGGGTTGGTGTAAAATAGGG-3) و LIN_{17} (5- TTTGAACGGGATTTCTG-3) که به این مجموعه ۵ میکرولیتر از دی ان آی مورد نظر اضافه شد. سپس نمونه های آماده شده در دستگاه ترموسایکلر (تکنه، کمبریج، انگلستان) با برنامه از پیش تعیین شده، گذاشته شد. محصول به دست آمده از انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد. سپس روی دستگاه ترانس ایلومیناتور قرار داده شده، از ژل باندها عکسبرداری و با توجه به شاخص وزنی، گونه انگل مشخص شد. در این مطالعه، به منظور برطرف نمودن اشکالات روش واکنش زنجیره ای پلی مراز دو مرحله ای [۸] از جمله وقت گیر بودن فرایند، دشواری اجراء به ویژه در بررسی های اپیدمیولوژیک و تشخیص بیماری با استفاده از نمونه های بالینی و دارا بودن عوامل مخدوش کننده بیش تر (از جمله آلودگی متقاطع)، روش واکنش زنجیره ای پلی مراز یک مرحله ای طراحی و استفاده شد که علاوه بر قابلیت تعیین گونه انگل و مقرون به صرفه بودن، از سهولت نسبی، حساسیت و ویژگی مناسبی نیز برخوردار می باشد.

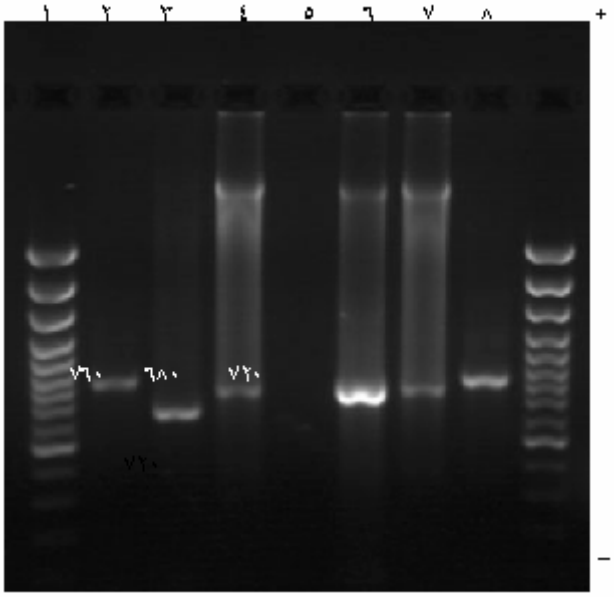
یافته ها:

علایم بالینی مشاهده شده در این گروه از بیماران بیش تر شامل آنمی، اسپلنومگالی و تب طولانی مدت بود. عمده ترین شکایت بیماران درد شکم، تب بالا و کاهش اشتها بود. در آزمایش های سرولوژی بیماران از آزمون ایمونوفلوروسنت غیر مستقیم استفاده شد. در این آزمون تیترآنتی‌بادی ۱:۱۲۸ و بالاتر به عنوان تیتر مثبت در نظر گرفته شد که تمامی بیماران مذکور دارای عیار آنتی‌بادی ضد لیشمانیایی احشایی برابر ۱:۱۲۸ و بالاتر بودند و بنابراین از نظر سرولوژی مثبت می باشند. با بررسی اسمیرهای مستقیم مغز استخوان، آماستیگوت‌های انگل (اجسام لیشمن) به تعداد زیاد مشاهده شد .

برای تعیین گونه انگل در روش واکنش زنجیره ای پلی‌مراز، باند حاصل برای لیشمانیا اینفانتوم ۷۲۰ جفت باز، لیشمانیا تروپیکا ۷۶۰ جفت باز و برای لیشمانیا ماژور ۶۸۰ جفت باز می باشد. در آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز روی تمامی نمونه های جدا شده از بیماران مبتلا به کالاآزار مورد مطالعه، باندی به اندازه ۷۲۰ جفت باز ایجاد نمودند. مقایسه باندهای حاصل از نمونه های جدا شده این بیماران با گونه های استاندارد مشخص کرد که گونه انگل مولد لیشمانیوز احشایی در تمامی آن ها، لیشمانیا اینفانتوم می باشد (تصویر۱).

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر۱: نتیجه الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره ای پلی مراز اختصاصی نمونه های مغز استخوان با پرایمرهای LIN_{17} و $LINR_4$ در ژل آگاروز ۱/۵ درصد.

۱- مارکر bp ۱۰۰
۲- استاندارد $L.t$
۳- استاندارد $L.m$
۴- استاندارد $L.i$
۵- کنترل منفی
۶- $L.i$ (مغز استخوان)
۷- $L.i$ (مغز استخوان)
۸- استاندارد $L.t$

بحث و نتیجه گیری:

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عامل اصلی بیماری کالاآزار در شهرستان جهرم در استان فارس (به عنوان یک کانون مهم بیماری در ایران) لیشمانیا اینفانتوم می باشد.

استان فارس به عنوان یکی از مهم ترین کانون های شناخته شده کالاآزار در کشور و شهرستان های فیروزآباد و جهرم کانون های اصلی بیماری کالاآزار در این استان می باشند. در مطالعه ادریسیان و همکاران در سال ۱۳۶۹ روی انسان و مخازن حیوانی (سگ و سگ سانان) با استفاده از روش های سرولوژی ایمونوفلوروسنت غیر مستقیم (IFA) و آگلوتیناسیون مستقیم (DAT) ، میزان درصد مثبت سرمی کودکان زیر ۱۲ سال ۱/۸ درصد و میزان شیوع عفونت در سگ های منطقه ۴۱/۶ درصد گزارش شده است [۶ و ۹].

به طور کلی یکی از اصول مهم در کنترل و پیش گیری بیماری لیشمانیوز، شناسایی و تعیین مشخصات گونه های مختلف ایجاد کننده آن می باشد. همچنین تعیین سوش غالب در یک منطقه می تواند در مطالعات دارویی، تهیه واکسن و تهیه آنتی ژن مناسب تشخیص بیماری کاربرد داشته باشد. تعیین هویت انگل های مولد لیشمانیوز احشایی از یک طرف به دلیل پیچیده تر شدن الگوی بالینی بیماری ناشی از افزایش موارد ابتلا به بیماری هایی چون ایدز در کشور های در حال توسعه و جهان سوم و از طرف دیگر به دلیل گزارش های متعدد از توانایی ایجاد عفونت احشایی به وسیله سوش های انگل لیشمانیا تروپیکا در انسان از نقاط مختلف دنیا، باعث بروز نگرانی هایی در خصوص اپیدمیولوژی این بیماری شده است [۶ و ۱۰ – ۱۱]. در مطالعه حاضر برای اولین بار مشخصات عامل مولد بیماری کالاآزار در جهرم به کمک روش واکنش زنجیره ای پلی‌مراز تعیین شد.

به طور کلی جهت تعیین گونه انگل های لیشمانیا، روش های مختلف مولکولی و بیوشیمیایی استفاده می شوند که روش واکنش زنجیره ای پلی مراز به دلیل آن که به صورت مستقیم روی ژنوم انگل تأکید دارد و امروزه طبقه‌بندی موجودات مختلف بر پایه این خصوصیات ژنتیکی تعریف می شود، دارای ارزش ویژه ای است. از مزایای این روش در تشخیص کالا آزار می‌توان به تشخیص سریع، حساسیت بالا، عدم نیاز به کشت انگل و استفاده از اسلایدهای بایگانی شده بیماران و به طور کلی امکان انجام آن روی نمونه های بالینی به صورت مستقیم اشاره نمود [۱۲]. تا کنون روش‌های واکنش زنجیره ای پلی‌مراز انواع مختلفی از دی ان آی لیشمانیایی را برای تکثیر مورد هدف قرار داده اند. طبق تحقیقات انجام شده، به نظر می رسد روش تکثیر حلقه‌های کوچک دی ان آی کینتوپلاستی لیشمانیا با توانایی فراهم کردن بیش ترین حساسیت و ویژگی از بهترین اهداف باشد. تعداد زیادی کپی (۱۰هزار کپی) از این حلقه های کوچک در هر سلول انگل لیشمانیا موجود است که طول متوسط هر یک بین ۷۰۰ تا ۱۰۰۰ جفت نوکلئوتید می‌باشد. هر یک از

www.SID.ir

Archive of SID

این حلقه ها از دو قطعه ثابت و متغیر تشکیل شده اند که سکانس قطعه ثابت در گونه های مختلف لیشمانیا یکسان بوده و لذا از تکثیر آن برای تشخیص جنس لیشمانیا استفاده می شود، اما سکانس و طول قطعه متغیر، متفاوت بوده و بنابراین با تکثیر آن و بر اساس تفاوت وزن باندهای حاصل می توان گونه های مختلف را جدا سازی نمود. از پرایمرهای $LINR_4$ و LIN_{17} در این تحقیق برای تامین چنین هدفی با اقتباس از روش آرانسای و همکاران [۸] استفاده شده است [۱۲–۱۵]. البته این محقق، روش واکنش زنجیره ای پلی مراز semi-nested را که یک روش واکنش زنجیره ای پلی مراز دو مرحله ای است معرفی کرده است.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد عامل مولد بیماری کالاآزار در شهرستان جهرم به عنوان کانون مهم بیماری در ایران، لیشمانیا اینفانتوم می باشد. در مطالعه مشابه انجام شده در استان کهگیلویه و بویر احمد روی ۶ بیمار مبتلا به کالاآزار بستری در بیمارستان کودکان یاسوج، عامل مولد لیشمانیوز احشایی نیز لیشمانیا اینفانتوم گزارش شده است [۱۶]. در مطالعه مظلومی و همکاران در شمال غرب ایران، گونه انگل تمامی ۲۱ نمونه جدا شده از بیماران مبتلا به کالاآزار، لیشمانیا اینفانتوم بوده است [۱۷]. در مطالعه محبعلی و همکاران در مناطق آندمیک ایران نیز لیشمانیا اینفانتوم از سگ و شغال (مخازن کالاآزار) جدا شد [۲]. در مطالعه فخار و همکاران روی اسلایدهای آسپیراسیون مغز استخوان تهیه شده از مناطق مختلف استان فارس، با روش های semi-nested PCR و species-specific PCR و microsatellite، گونه اصلی بیماری لیشمانیا اینفانتوم و عامل دوم سوش احشاء دوست، لیشمانیاتروپیکا گزارش شده است [۱۸ و ۱۹].

در مجموع، نتایج این مطالعه برای اولین بار مشخص نمود که عامل مولد کالاآزار در شهرستان جهرم لیشمانیا اینفانتوم است. روند رو به رشد کالاآزار در استان فارس و استقرار عشایر در بعضی از نواحی این استان حاکی از بازپدیدی بیماری در این استان است. با توجه به این که بیماری مذکور در ایران اغلب در بین روستاییان شایع بوده و بیش ترین موارد بیماری در بین عشایر ایران گزارش شده است [۲–۳ و ۱۶ و ۱۹–۲۰]، لذا مناطق عشایر نشین این استان را می توان جز مناطق پر خطر کشور قلمداد کرد.

تقدیر و تشکر: بدین وسیله از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه های علوم پزشکی شیراز و مازندران برای حمایت مالی از این طرح و کارکنان محترم بیمارستان شهید مطهری به ویژه بخش پاتولوژی به خاطر همکاری در انجام این طرح تشکر و قدردانی می شود.

References:

1. Fakhar M, Motazedian MH, Asgari Q, et al. A new endemic focus of visceral leishmaniosis in southern Iran. Armaghane-danesh 2006; 11(2): 104-110. (Persian)
2. Mohebali M, Hajjaran H, Hamzavi Y, et al. Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniosis in the Islamic Republic of Iran. Vet Parasitol 2005; 129(3-4): 243-251.
3. Asgari Q, Fakhar M, Motazedian MH. Nomadic kala-azar in South of Iran. Iran J Public Health 2006; 35 (3): 85-86.
4. Alborzi A, Pouladfar GR, Fakhar M, et al. Isolation of *Leishmania tropica* from a patient with visceral leishmaniasis and disseminated cutaneous leishmaniasis, southern Iran . Am J Trop Med Hyg 2008; 79(3): 435-7.
5. Haghighat M, Khalgholah M. Study on visceral leishmaniasis in Jahrom town and suburban area. Darou Darman J 1991; 9 (98):33 - 36 (Persian)
6. Edrissian GH, Ahanchin AR, Gharachahi AM, et al. Seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis and search for animal reservoirs in Fars Province, southern Iran . Iran J Med Sci 1993 ; 18 (3 - 4): 99 - 105. (Persian)
7. Vince A, Poljak M, Seme K. DNA extraction from archival Giemsa-stained bone marrow slides: comparison of six rapid methods. Br J Heamatol 1998 ; 101(2): 349-531.
8. Aransay AM, Scoulica E, Tselentis Y. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies using semi nested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. Appl Environ Microbiol 2002; 66(5): 1933–1938
9. Health Center of Fars Province. Contagious ward. CDC data and statistics. 1380-1385 (Persian)
10. Magill AJ, Grogl M, Gasser RA, et al. Visceral infection caused by *Leishmania tropica* in veterans of operation desert storm. N Engl J Med 1993; 328 (19): 1383-87.
11. Geramizadeh B, Fakhar M, Motazedian MH. Visceral leishmaniasis with duodenal involvement: three immunocompetent cases from Southern Iran. Ann Trop Med Parasitol 2006; 100(7): 637-640.
12. Noyes HA, Reyburn H, Bailey JW, et al. A Nested PCR-based schizodeme method for identifying *Leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. J Clin Microbiol 1998 36 (10): 2877 – 2888
13. Lauchaud L, Chabbert E, Dubessay P, et al. Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood . J Clin Microbiol 2001; 39(2): 613-617.
14. Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. Exp Parasitol 1990; 71: 267-275.
15. Motazedian MH, Karamian M, Noyes HA, et al. DNA extraction and amplification of *Leishmania* from archived, Giemsa-stained slides, for the diagnosis of

www.SID.ir

Archive of SID

ntegrated pipeline for the development of novel panels of mapped microsatellite markers for *Leishmania donovani* complex, *Leishmania braziliensis* and *Leishmania major*. Parasitol 2008 135(5): 567-74.
19. Fakhar M, Motazedian MH, Asgari Q, et al. The efficacy of PCR for early diagnosis and detection of asymptomatic cases of visceral leishmaniasis in human and dog. J Jahrom Univ Med Sci 2010; 8(2): 1-7.
20. Keighobadi M, Fakhar M, Akramipour R, et al. Emerging of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Kermanshah Province. Proceedings of the Congress on Tropical and Infectious Diseases. Dec 2009; Tehran: Iran. (Persian)

cutaneous leishmaniasis by PCR. Ann Trop Med Parasitol 2002; 96(1): 31-34.
16. Sarkari B, Fakhar M, Hatam GhR, et al. Characterization of Leishmania parasites isolated from Kala-azar patients in Kohgiloyeh and BoyerAhmad, using semi-nested PCR. Armaghane - danesh: J Yasouj Univ Med Sci 2006; 11(1): 27-32. (Persian)
17. Mazloumi Gavgani AS, Esmaeli H, Davies CR. Species and strain identification of the *Leishmania* isolated from Kala-azar patients in North West of Iran Urmia Med J 2004; 15 (1): 39 - 46 (Persian)
18. Fakhar M, Motazedian MH, Daly D, et al. An

www.SID.ir

Archive of SID

Original article

Detection of *Leishmania* parasites species isolated from patients suffering from kala-azar using one-step PCR

Fakhar M*[1,2], Motazedian MH[3], Hashemi SA[4], Golkar A[5]

Received: 10/27/2010 Revised: 03/07/2011 Accepted: 04/11/2011

1. Dept. of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
2. Molecular and Cellular Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
3. Dept. of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences Shiraz, Iran
4. Dept. of Pathology, School of Medicine, Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran
5. School of Medicine, Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran

Journal of Jahrom University of Medical Sciences Vol. 9, No. 2 . Summer 2011

Abstract:

Introduction:
Visceral leishmaniasis (VL) or Kala-azar is an important parasitic diseases caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania* including *L. donovani*, *L. infantum*. Epidemiological evidences show that VL is frequently common in some areas of Jahrom district in Fars Province. This study aimed to characterize the causative agent of VL in this region.

Materials and Methods:
Bone marrow sample was obtained from 16 VL patients from Pediatric hospital in Jahrom town. DNA was extracted from the microscopic slides and checked by specific PCR to find out the species of the parasite. To do it, a segment of minicirclekinetoplast DNA was amplified, using LINR4 and LIN17 primers. Products of PCR were evaluated by electrophoresis, using 1.5% agarose.

Results:
Anti-leishmania antibody was detected in all patients by IFAT. Examination of bone marrow smears demonstrated numerous amastigotes of *Leishmania* (*Leishman* bodies) in the samples. All the samples produced a 720 bp band in PCR assay. The isolates were compared with reference strains and revealed that all the isolates are *L. infantum*.

Conclusion:
Our findings showed that species characterization with one-step PCR by LIN17 and LINR4 is simple and fast; it was also confirmed that the causative agent of VL in Jahrom is *L. infantum*.

Key words: Visceral Leishmaniasis, Kala-azar, *L. infantum*, Polymerase Chain Reaction, Bone Marro

* Corresponding author, Email: mahdif 53 @ yahoo.com

www.SID.ir