

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

احمد زارع زاده^۱، غلامرضا مطلب^{۲*}، هادی میر احمدی^{۳،۴} و علیرضا سلیمی خراشاد^{۴،۳}

^۱ ایران، زابل، دانشگاه زابل، پردیس خودگردان، گروه زیست‌شناسی

^۲ ایران، زابل، دانشگاه زابل، گروه زیست‌شناسی

^۳ ایران، زاهدان، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری

^۴ ایران، زاهدان، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، دانشکده پزشکی، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۲۲



چکیده

لیشمانیوز یک بیماری انگلی ناشی از گونه‌های لیشمانیا می‌باشد. تشخیص اولیه توسط علام بالینی و مشاهده مستقیم انگل است. حساسیت روش‌های مولکولی نسبت به دید مستقیم توسط میکروسکوپ بیشتر است. تاکنون مطالعات جامع و کاملی در زمینه تعیین هویت گونه انگل در استان سیستان و بلوچستان صورت نگرفته است. در این پژوهش گونه‌های لیشمانیا با استفاده از روش‌های مولکولی با هدف قرار دادن ژن ITS-rDNA در بیماران مراجعه‌کننده به مراکز درمانی استان سیستان و بلوچستان صورت گرفت. این مطالعه در سال ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۴ انجام گرفت. ۸۲ نمونه لام مثبت جهت مطالعات مولکولی جمع‌آوری گردید. بخشی از نمونه‌های برداشت شده به محیط کشت N. N. N تلقیح و برای تکثیر سریع و ازدیاد به محیط کشت RPMI-1640 همراه با ۱۰ درصد سرم جنین گوساله انتقال داده شد. پس از استخراج DNA با استفاده از تکنیک PCR-RFLP تعیین گونه‌های لیشمانیا صورت گرفت. نرم افزارهای SPSS و multalin جهت آنالیز نتایج استفاده گردید. تعداد ۴۶ بیمار (۵۶٪) آلوده به لیشمانیا ماژور و ۳۶ بیمار (۴۴٪) آلوده به لیشمانیا تروپیکا تشخیص داده شد. گونه غالب در شهرستان چابهار گونه لیشمانیا تروپیکا و در شهرستان میرجاوه لیشمانیا ماژور بود. در مرکز استان هردو گونه لیشمانیا ماژور و تروپیکا مسؤل بیماری تشخیص داده شد. روش PCR-RFLP دارای حساسیت و اختصاصیت بالا بوده و برای تشخیص لیشمانیوزها و تعیین گونه سریع انگل‌های عامل بیماری مناسب می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ژن ITS-rDNA، لیشمانیا ماژور، لیشمانیا تروپیکا، PCR-RFLP، استان سیستان و بلوچستان

* نویسنده مسؤل، تلفن: ۰۵۴۳۱۲۳۲۱۸۰، پست الکترونیکی: reza.motaleb@uoaz.ac.ir

مقدمه

واکنش سیستم ایمنی میزبان، تظاهرات بالینی متفاوتی خواهد داشت این تظاهرات از عفونت تحت بالینی محدود شونده تا ضایعات منتشر و پیشرونده پوست، غشاء مخاطی و سیستم رتیکولو آندوتلیال متغیر می‌باشد (۴). این بیماری در تمام قاره‌های جهان به جز استرالیا و اقیانوس منجمد شمالی دیده شده است و در حال حاضر

لیشمانیوز جلدی (سالک) یک عفونت انگلی پوستی است که توسط گونه‌های مختلف تک یاخته لیشمانیا ایجاد می‌شود. این بیماری توسط گزش پشه‌خاکی به انسان انتقال پیدا می‌کند و در میزبان انسانی لیشمانیا به صورت انگلهای اجباری درون سلولی، فاگوسیت‌های تک هسته‌ای را آلوده می‌کند. ابتلا به این بیماری با توجه به نوع گونه انگل و

مناطق کد کننده 5.8S و 18S، قطعه ITS1 و حد فاصل مناطق 5.8S و 28S، قطعه ITS2 قرار دارد. این مناطق بر خلاف مناطق کد کننده تنوع بین گونه ای بیشتری نشان می‌دهند و برای تفکیک گونه ها از آنها استفاده می شود. ساختار rDNA در یوکاریوت ها ساختمان ثابتی را نشان می دهد و کل ساختار آن از ۵' به ۳' شامل ناحیه IGS (Intergenic Spacers) که جزء قطعات غیر رونویسی می باشد. پس از آن در انتهای ۵' External Transcribed ETS1 (Spaser 1) و در انتهای ۳' ETS2 (External Transcribed Spaser2) قرار دارد. همراه این قطعات در نواحی مختلف، ژن های 18S rDNA، Internal Transcribed 5.8S rDNA ناحیه Spacers1(ITS1)، ژن 5.8S rDNA ناحیه ITS2 (Transcribed Spacer 5) و ژن 28SrDNA قرار دارد. قطعات ژنی این دو ناحیه (ITS1 و ITS2) در بین یوکاریوت ها محافظت شده می باشند و برای درک ارتباطات فیلوژنیک مفیدند (۱۲). استان سیستان و بلوچستان در جنوب شرق ایران واقع شده است و با کشورهای پاکستان (۹۰۰ کیلومتر) و افغانستان (۳۰۰ کیلومتر) مرز مشترک دارد. این استان با وسعتی حدود ۱۸۱/۷۸۵ کیلومتر مربع، پهناورترین استان ایران می‌باشد (۹). لذا این منطقه احتمالاً دارای اهمیت و نقش ویژه ای در ورود و صدور آلودگی به انگل لیسمانیا توسط افراد آلوده و ساکن در نواحی مرزی می باشد. با این وجود گونه مسئول در این منطقه نامشخص است. در حال حاضر با وجود بروز نسبتاً بالای بیماری در استان و عدم انجام مطالعات مدون و دقیق در شهرهای استان هویت انگل در برخی کانون های اندمیک استان مشخص نشده است. در این تحقیق، نمونه های انسانی از استان سیستان و بلوچستان جمع آوری، هم به روش میکروسکوپی و هم مولکولی عامل بیماری، مورد مطالعه قرار گرفت تا هویت انواع انگل لیسمانیا، در این منطقه بطور قطعی تعیین و تأیید گردد.

لیسمانیازیس در ۸۸ کشور جهان در قاره‌های آسیا، اروپا، آفریقا و آمریکا دیده می‌شود که در میان این کشورها ۷۲ کشور در حال توسعه و ۱۳ کشور کمتر توسعه یافته وجود دارد. در سال ۱۳۹۰ شهر های شیراز، مشهد، اصفهان و استانهای گلستان، کرمان، خوزستان، ایلام، یزد، سیستان و بلوچستان، سمنان، قم، خراسان شمالی و بوشهر بیشترین موارد الودگی را داشته اند (۲). بالغ بر ۸۰٪ موارد سالک کشور نوع روستایی میباشد (۲). بیماری لیسمانیوز جلدی در روستاهای پانزده استان ایران که بدلیل لیسمانیا میجرایجاد شده اند یکی از مشکلات جدی و رو به افزایش می باشد که به شکل بومی دیده می شود (۱۱ و ۱۴). در جنوب و جنوب شرق مناطق فارس، سیستان و بلوچستان، خوزستان و ایلام در جنوب غربی، در شمال شرق نواحی لطف آباد و ترکمن صحرا، اصفهان و ابردژ ورامین و یزد در مرکز ایران از مهمترین کانونهای بومی بیماری میباشد (۱۳ و ۱۵). مشخصات گونه های مختلف جنس لیسمانیا به عوامل متعددی از قبیل توزیع جغرافیایی انگل، تظاهرات بالینی و اپیدمیولوژی بیماری، ناقل و مخزن حیوانی بستگی دارد (۱۰ و ۸). انگلهای لیسمانیا از نظر شکل ظاهری قابل تفکیک نیستند و تا پیش از توسعه روشهای جدید، شناسایی و تفکیک گونه های 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 (۱۹). در حال حاضر به کمک روشهای نوین زیست شناسی مولکولی مانند انواع پی سی آر پیشرفته و شناساگرهای مولکولی، شناسایی گونه های متفاوت جنس لیسمانیا میسر گردیده است (۲۲). ژنهایی مانند دی ان ای ریپوزومی (۲۰)، منطقه ایجاد کننده مکان رونویسی داخلی (۷)، ژن توبولین (۱۳)، ژن گلیکوپروتئین ۶۳ کیلودالتونی (۲۱)، ریزماهواره های دی ان ای (۱۵) و دی ان ای کیتوپلاستی (۱۶ و ۱۲) برای شناسایی انگل لیسمانیا توسط محققین و پژوهشگران استفاده شده اند. حد فاصل

مواد و روشها

نمونه های مورد استخراج و یا DNA از سر سمپلر های فیلتر دار استفاده و در هربار کشیدن محلولها سر سمپلر تعوض گردید. استخراج مطابق پروتکل کیت شرکت تکاپو زیست صورت گرفت. DNA تخلیص شده را همراه با شناساگر bp ۱۰۰ الکتروفورز و به صورت کیفی مقدار DNA مشخص گردید. برای این منظور ۵ میکرولیتر از محلول DNA را بهمراه یک میکرولیتر بافر بارگیری بر روی ژل آگار ۰.۸ درصد ۱۰ میکرو لیتر در ژل نمونه گذاری و الکتروفورز و در زیر نور ماوراء بنفش با استفاده از دستگاه UV-transiluminator مشاهده گردید.

انجام آزمایش PCR : حجم کل واکنش PCR در این مرحله ۱۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد که مقدار و ترتیب مواد شرکت کننده در واکنش PCR1 در جدول ۲ آمده است.

نام ماده	مقدار مورد استفاده
DNA الگو	۳ میکرو لیتر
آب مقطر دوبار تقطیر بدون نوکلئاز	۳.۵ میکرو لیتر
Master Mix (Bioneer, Korea)	۷.۵ میکرو لیتر
پرایمر IR (تکاپو زیست)	۱ میکرو لیتر

برای انتخاب بهترین دمای آنلینگ، PCR با ۴ دمای ۵۶، ۵۸، ۶۰، ۶۲ سانتیگراد انجام شد که بهترین باندها در دمای ۵۸ درجه سانتیگراد برای هر دو گونه انگل حاصل گردید. و پس از بهینه کردن PCR. برای تکثیر ژن از برنامه دمائی طبق جدول ۳ استفاده شد.

با توجه به اینکه محصول PCR مرحله اول باندهای مناسب نداشتیم (چون استخراج از لامهای رنگ آمیزی شده کم انگل و پر انگل بودند صورت گرفته بود)، به همین منظور از روش Nested PCR (PCR2) استفاده گردید.

بیماران مراجعه کننده به مراکز بهداشتی و درمانی استان سیستان و بلوچستان (ایران شهر، چابهار، خاش، زابل، زاهدان، میرجاوه و نیکشهر) پس از معاینه توسط پزشک به آزمایشگاه معرفی و پس از تکمیل پرسشنامه اقدام به تهیه اسمیر مستقیم گردید. تعداد نمونه ها براساس اطلاعات آماری ۸۲ نمونه در نظر گرفته شد. از هربیمار سه نمونه لام (گسترش) از نقاط مختلف ضایعه جلدی تهیه شد. گسترش تهیه شده بدون استفاده از شعله و در هوای اتاق خشک گردید. سپس متانول، به مدت ۳۰ تا ۶۰ ثانیه (جهت فیکس کردن) روی لام ریخته و در مجاورت هوا خشک گردید. محلول گیمسا (۱:۱۰) با آب (pH ۷.۲) رقیق، لام را روی پل رنگ آمیزی قرار داده و به مدت ۱۵ دقیقه بروی آن محلول گیمسا ریخته شد. سپس لام را برای مدت کوتاهی در آب (pH ۷.۲) قرار داده و در مجاورت هوا خشک و آماده مطالعه گردید. نمونه های جمع آوری شده زیر میکروسکوپ نوری با درشت نمایی هزار برابر از نظر وجود جسم لیشمن مورد بررسی قرار گرفته و مطابق با جدول شماره ۱ درجه بندی گردید.

تعداد انگل	تعداد فیلد	درجه مشاهده
۰	۱۰۰۰	میکروسکوپ
۰-۱۰	۱۰۰۰	میکروسکوپ
۱-۱۰	۱۰۰	میکروسکوپ
۱-۱۰	۱۰	میکروسکوپ
۱-۱۰	در هر فیلد	میکروسکوپ
۱۰-۱۰۰	در هر فیلد	میکروسکوپ
۱۰۰-۱۰۰۰	در هر فیلد	میکروسکوپ

جهت تخلیص DNA از کیت استخراج DNA شرکت تکاپو زیست استفاده گردید که به روش ستونی استخراج صورت می گیرد برای جلوگیری از الودگی محتویات کیت به

جدول ۳- مراحل واکنش PCR1 و PCR2

مرحله واکنش	زمان	دما (درجه سانتی گراد)
واسرشت رشته الگو	۵ دقیقه	۹۴
واسرشت رشته ساخته شده	۴۵ ثانیه	۹۴
دمای اتصال پرایمر	۴۵ ثانیه	۵۸
فعالیت آنزیم DNA پلی مراز	۶۰ ثانیه	۷۲
برای اطمینان از ساخت کامل قطعات	۵ دقیقه	۷۲
مرحله ۲ تا ۴ (۳۵ سیکل تکرار)	---	---
دمای ۴ درجه ساتیگراد	---	---

۳) میکرولیتر DNA ۶، میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر بدون نوکلئاز (DDW)، ۱۰ میکرولیتر MasterMix و ۱ میکرولیتر پرایمر ITS. توالی پرایمرها در جدول ۴ ارائه شده که از شرکت تکاپو زیست تهیه گردید.

جهت Nested PCR، از محصول PCR1، ۲ میکرولیتر برداشته و به میکروتیوب ۰٫۲، منتقل و به آن ۴۸ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه و از آن بعنوان DNA الگو در Nested PCR (PCR2) استفاده نمودیم. حجم کل واکنش PCR در این مرحله ۲۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد

جدول ۴- مشخصات پرایمر ۱ (۱۶) و ۲

پرایمر	توالی
Forward : IR1	5'-GCTGTAGGTGAACCTGCAGCAGCTGGATCATT-3'
Reverse : IR2	5'-GCGGGTAGTCCTGCCAAACACTCAGGTCTG-3'
Forward : ITS1F	5'-GCAGCTGGATCATTTTCC-3'
Reverse : ITS2R	5'-ATATGCAGAAGAGAGGAGGC-3'

با تکثیر ناحیه ITS باند حاصل 480bp برای تمام گونه های انگل یکسان می باشد و افتراق گونه های انگل غیر ممکن می باشد به همین دلیل برای تعیین گونه انگل به محصول PCR آنزیم محدود کننده معرفی شده توسط Dweik را اضافه نمودیم، این آنزیم توالی ITS1 را در قسمت GG↓CC برش می دهد می کندودر انگل لیسمانیا با توجه به تعداد نقاط برش محل های مختلفی قطع خواهند شد به همین منظور آنزیم BSURI مناسب تشخیص داده شد که پس از الکتروفورز، محصول به صورت باندهای جداگانه بر روی ژل قابل رویت بود و می توانستیم گونه های انگل را

برای تأیید تکثیر ژنوم و اندازه قطعه تکثیر شده از الکتروفورز روی ژل آگارز استفاده شد به این ترتیب که ۳ میکرولیتر از محصول PCR1 و ۳ میکرولیتر از محصول Nested PCR را به صورت جداگانه (۱ میکرولیتر لدر درچاهک اول و ۵ میکرولیتر محصول PCR1 و ۵ میکرولیتر از محصول PCR2) به ژل ۲ درصد اضافه گردید و جریان الکتروفورز با ولتاژ ۹۰ به مدت ۴۰ دقیقه برقرار و از محصول عکس برداری به عمل آمد.

RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism)

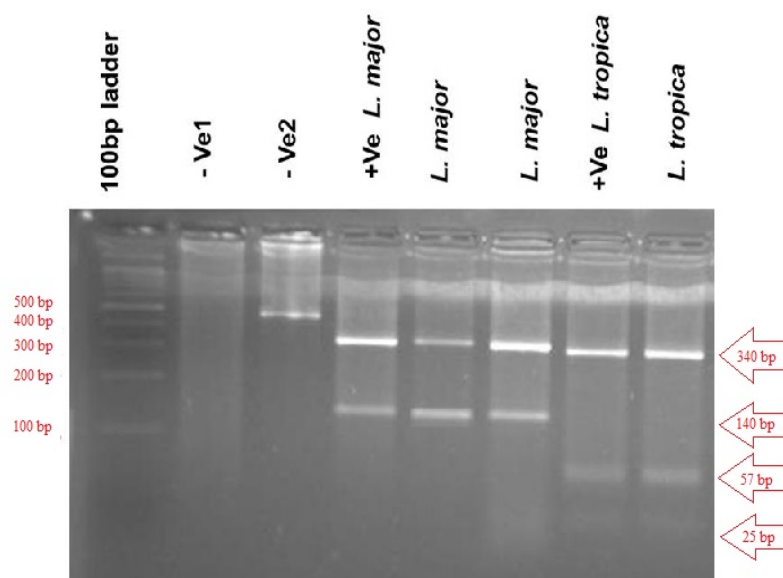
analysis using parsimony (PAUP) بهره گرفته شد. آزمون کای اسکویر با درجه اطمینان ۹۵ درصد بوسیله نرم افزار SPSS 16 (SPSS Inc., USA) برای مقایسه میانگینها استفاده گردید.

نتایج

در بررسی های میکروسکوپی از لام های رنگ آمیزی شده با گیمسا از ۶۰۵ لام تهیه شده ۳۱۲ نمونه مثبت شد که علت مشاهده نشدن آماستیگوت در بقیه لامها می تواند مشابه بودن ظاهر کلینکی زخم با سایر ضایعات پوستی، آلودگی میکروبی و قارچی زخم ها، کم بودن تعداد انگل در اسمیرهای تهیه شده و تکنیک ضعیف نمونه برداری از ضایعات باشد. در نهایت ۸۲ لام مثبت جهت مطالعات مولکولی انتخاب گردید. ژن تکثیر شده ITS-rDNA با اندازه ۴۸۰ جفت باز وقتی که تحت تاثیر آنزیم *BsuR1* قرار می گیرد، در گونه لیشمانیا ماژور به دو قطعه ۱۴۰ و ۳۴۰ جفت باز، در لیشمانیا تروپیکا به چهار قطعه ۲۵، ۳۸، ۵۷ و ۳۶۰ جفت باز برش داده می شود که نتایج آن در شکل ۱ و جدول ۵ مشاهده می شود.

از روی این قطعات و طول باندها از یکدیگر متمایز نماییم و با مشاهده پلی مورفیسم ایجاد شده در اثر هضم آنزیمی که برای هرگونه اختصاصی است توانستیم به نوع انگل پی ببریم. ۱۵ میکرولیتر حجم نهایی واکنش در این مرحله می باشد که مواد زیر با هم در میکرو تیوب ۰,۲ به شرح ذیل ترکیب شدند: ۱۰ میکرولیتر محصول PCR، 1 میکرولیتر بافر ۲ مخصوص آنزیم، ۱ میکرو لیتر آنزیم محدود کننده و ۷ میکرو لیتر آب مقطر ۲ بار تقطیر بدون نوکلئار به میکرو تیوبهای ۰,۲ منتقل و درب میکرو تیوبها جهت جلوگیری از تبخیر مواد واکنش با پارافیلیم مسدود گردید و میکرو تیوبها به مدت ۸ ساعت در ۳۷ درجه اینکوبه گردید.

تجزیه و تحلیل اطلاعات: کلیه ی محصولات PCR که در آن ژن ITS-rDNA تکثیر پیدا کرده و دارای باند قوی و نسبتاً خوبی بودند بطور مستقیم و بدون کلون کردن تعیین توالی شدند. نرم افزار Sequencher™4.1.1 software برای توالی DNA نمونه های مثبت مطابقت کردن نوکلئوتیدها با نوکلئوتید کروماتوگرافی هر نمونه مورد استفاده قرار گرفت. برای آنالیزهای فیلوژنتیکی نیز از نرم افزار Phylogenetic



شکل ۱- نتایج الکتروفورز محصولات PCR روی ژل نتیجه الکتروفورز ژن تکثیر یافته ITS-rDNA بر روی ژل آگارز ۲ درصد در گونه های مشخص شده لیشمانیا از استان سیستان و بلوچستان که تحت اثر آنزیم *BsuR1* قرار گرفته است. -Ve1: کنترل منفی (با آنزیم بدون محصول); -Ve2:

کنترل منفی (با محصول بدون آنزیم); $Ve+$: کنترل مثبت.

جدول ۵- قطعات حاصل از عملکرد آندونکلئازی آنزیم BSUR1 بر روی محصول ژن ITS DNA

<i>Leishmania species</i>	Number of fragment	Digestion position in 5'end	Size of fragments(bp)
<i>Leishmania major</i>	2	140	140,340
<i>Leishmania tropica</i>	4	41,65,122	25,38,57,360

عامل بیماری وجود ندارد (جدول ۸).

جدول ۷- پراکنندگی زخمها بر حسب محل ضایعه ($p>0.05$)

محل ضایعه	تعداد	درصد
سرو صورت	۶۲	۱۹,۹
دست	۱۶۵	۵۲,۹
پا	۷۵	۲۴
تنه	۱۰	۳,۲
مجموع	۳۱۲	۱۰۰

جدول ۸- پراکنش جغرافیایی

منطقه جغرافیایی	تعداد	لیشمانیا ماژور	لیشمانیا تروپیکا	درصد
ایران شهر	۱	۱	۰	۱,۳
چابهار	۱۲	۰	۱۲	۱۲,۵
خاش	۶	۴	۲	۶,۳
زابل	۵	۳	۲	۷,۵
زاهدان	۳۷	۱۹	۱۸	۴۶,۳
میرجاوه	۱۹	۱۷	۲	۲۲,۵
نیکشهر	۲	۲	۰	۲,۵
جمع	۸۲	۴۴	۳۶	۱۰۰

شکل ۲، مقایسه توالی هاپلوتایپ های مشترک ژن ITS لیشمانیا تروپیکا و ماژور را با هاپلوتایپ های ثبت شده در GenBank و لیشمانیا ماژور و تروپیکا جدا شده از مبتلایان در شمال، جنوب و مرکز استان که با نرم افزار آنالین multalin تهیه و مقایسه شده اند را نشان می دهد. آنالیز سکانس ها، ۳ تفاوت نوکلئوتیدی در جایگاه های ۱۱، ۲۸۳، ۴۲۰ را مشخص نمود.

در این تحقیق از ۸۲ نمونه اینکه با هدف قرار دادن ژن ITS به وسیله ی پرایمرهای TSF1 و ITS2R و تکنیک RFLP بررسی گردید. از ۸۲ نمونه آنالیز شده ۵۸ مورد مربوط به جنس مذکر و ۲۴ مورد مربوط به جنس مونث می باشد.

جدول ۶- توزیع فراوانی موارد مثبت لیشمانیایی در نمونه های جدا شده از زخم بیماران

گونه	تعداد	درصد
لیشمانیا ماژور	۴۶	۵۶,۱
لیشمانیا تروپیکا	۳۶	۴۳,۹
مجموع	۸۲	۱۰۰

افراد دارای زخم در محدوده سنی ۱ تا بالای ۶۰ سال بودند و بیشترین گروه سنی مبتلایان به سالک گروه های سنی ۱۰-۱ سال با ۲۵,۶٪ و گروه سنی ۲۰-۱۱ سال با ۳۰,۴٪ و گروه سنی ۳۰-۲۱ با ۱۹,۵٪ ابتلا را شامل می شوند و افراد گروه سنی ۴۱ تا بالای ۶۰ سال کمترین مبتلایان به بیماری می باشند. بیشترین موارد تعداد ضایعات مربوط به یک زخم بود (۵۶ درصد) که بر اساس آزمون χ^2 ارتباط معنی داری بین تعداد زخم و گونه عامل بیماری وجود ندارد. دست و پا بیشترین فراوانی زخم را داشتند و کمترین موارد تعداد ضایعه در تنه مشاهده گردید (جدول ۷) که بر اساس آزمون χ^2 ارتباط معنی داری بین تعداد زخم و گونه عامل بیماری وجود ندارد.

از تعداد ۸۲ بیمار مبتلا به سالک جلدی تعداد ۴۹ مورد ساکن شهر و تعداد ۳۳ مورد ساکن روستاها بودند که بر اساس آزمون χ^2 ارتباط معنی داری بین تعداد زخم و گونه

```

70
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
gi|1027901346|gb|KU949582.1| L -----TATACA CTACGGGGAG GCTTATTCTA
TATATATATA GTATAGGCTT
Leishmania major isolate Zahed -----ATATACA ACTCGGGGAG GCTTATTCTA
TATATATATA GTATAGGCTT
Leishmania major isolate Zahed CCGATGATTA CACCCCAAAA AACATATACA ACTCGGGGAG GCTTATTCTA
TATATATATA GTATAGGCTT
Leishmania major isolate Zahed -----AG GCTNATTCTA
TATATATATA GTATAGGCTT

80      90      100     110     120
130      140
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
gi|1027901346|gb|KU949582.1| L TTCCACATA CACAGCAAAC TTTTATACTC GAAATTTGCA GTAAAAAAGG
CCGATCGACG TTGTAGAACG
Leishmania major isolate Zahed TTCCACATA CACAGCAAAC TTTTATACTC AAAGTTTGCA GTAAAAAAGG
CCGATCGACG TTGTAGAACG
Leishmania major isolate Zahed TTCCACATA CACAGCAAAC TTTTATACTC AAAATTTGCA GTAAAAAAGG
CCGATCGACG TTGTAGAACG
Leishmania major isolate Zahed TTCCACATA CACAGCAAAC TTTTATACTC AAAATTTGCA GTAAAAAAGG
CCGATCGACG TTGTAGAACG

150     160     170     180     190
200      210
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
gi|1027901346|gb|KU949582.1| L CACCGCCTAT ACACAAAAGC AAAAATGTCC GTTTATACAA AAAAAATAGAC
GGCGTTTCGG TTTTGGCGG
Leishmania major isolate Zahed CACCGCCTAT ACACAAAAGC AAAAATGTCC GTTTATACAA AAAAAATAGAC
GGCGTTTCGG TTTTGGCGG
Leishmania major isolate Zahed CACCGCCTAT ACACAAAAGC AAAAATGTCC GTTTATACAA AAAAAATAGAC
GGCGTTTCGG TTTTGGCGG
Leishmania major isolate Zahed CACCGCCTAT ACACAAAAGC AAAAATGTCC GTTTATACAA AAAGATAGAC
GGCGTTTCGG TTTTGGCGG

220     230     240     250     260
270      280
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
gi|1027901346|gb|KU949582.1| L GAGGGANANA NAGGGGGGTG CGTGCGCGTG GATAACGGCT CACATAACGT
GTCGCGATGG ATGACTTGGC
Leishmania major isolate Zahed GAGGGAGAGA GAGGGGGGTG CGTGCGCGTG GATAACGGCT CACATAACGT
GTCGCGATGG ATGACTTGGC
Leishmania major isolate Zahed GAGGGAGAGA GAGGGGGGTG CGTGCGCGTG GATAACGGCT CACATAACGT
GTCGCGATGG ATGACTTGGC
Leishmania major isolate Zahed GAGGGAGAGA GAGGGGGGTG CGTGCGCGTG GATAACGGCT CACATAACGT
GTCGCGATGG ATGACTTGGC

290     300     310     320     330
340      350
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
gi|1027901346|gb|KU949582.1| L TTCTATTTC GTTGAAGAAC GCAGTAAAGT GCGATAAGTG GTATCAATTG
CAGAATCATT CAATTACCGA
Leishmania major isolate Zahed TTCTATTTC GTTGAAGAAC GCANNAAGN GCGATAAGTG GTATCAATTG
CAGAATCATT CAATTACCGA
Leishmania major isolate Zahed TTCTATTTC GTTGAAGAAC GCAGTAAAGT GCGATAAGTG GTATCAATTG
CAGAATCATT CAATTACCGA
Leishmania major isolate Zahed TTCTATTTC GTTGAAGAAC GCAGTAAAGT GCGATAAGTG GTATCAATTG
CAGAATCATT CAATTACCGA

360     370     380     390     400
410      420
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
gi|1027901346|gb|KU949582.1| L ATCTTTGAAC GCAAACGGCG CATGGGANAA GCTCTATTGN GTCATCCCCG
TGCATGCCAT ATTCTCAGTG
Leishmania major isolate Zahed ATCTTTGAAC GCAAACGGCG CATGGGAGAA GCTCTATTGT GTCATCCCCG
TGCATGCCAT ATTCTCAGTG
Leishmania major isolate Zahed ATCTTTGAAC GCAAACGGCG CATGGGAGAA GCTCTATTGT GTCATCCCCG
TGCATGCCAT ATTCTCAGTG

```

Leishmania major isolate Zahed ATCTTTGAAC GCAAACGGCG CATGGGAGAA GCTCTATTGT GTCATCCCCG
TGCATGCCAT ATTCTCAGTG

	430	440	450	460	

gi 1027901346 gb KU949582.1 L	TCGAACAAAA	AACAACACGC	C	-----	-----
Leishmania major isolate Zahed	TCGAACAAAA	AACAACACGC	CGCCTCCTCT	CTTCTGCATA	TA
Leishmania major isolate Zahed	TCGAACAAAA	AACAACACGC	CGCCTCCTCT	CTTCTGCATA	TA
Leishmania major isolate Zahed	TCGAACAAAA	AACAACACGC	CGCCTCCTCT	CTTCTGCATA	TA

شکل ۲- نتایج سکونسیک

بحث

لیشمانیا ماژور بوده است (۲۳). در مطالعه واعظ نیا و همکاران در مشهد، ۳۴ درصد نمونه‌ها لیشمانیا ماژور بود که تقریباً مشابه نمونه‌های انسانی و حیوانی کانون بومی بیماری لیشمانیوز جلدی در بخش مرکزی قم می‌باشد. در ضمن ۶۶ درصد نمونه‌ها لیشمانیا تروپیکا بودند (۲۴). در مطالعه دیگری در خصوص تعیین هویت انگل لیشمانیا با استفاده از تکنیک PCR-RFLP در لام‌های رنگ آمیزی شده مربوط به بیماران و جوندگان مخزن لیشمانیوز جلدی در شهرستان دامغان، از ۲۵ نمونه انسانی و ۸ نمونه جونده رومبومیس اپیموس مورد آزمایش، مشخص شد که انگل موجود در لام‌های انسانی و جوندگان، لیشمانیا ماژور (عامل لیشمانیوز جلدی روستایی) می‌باشد (۲۵). علت ناهمخوانی نتایج مطالعه مذکور با تحقیق حاضر می‌تواند وسعت منطقه جغرافیای مورد مطالعه و وجود کانوهای متعدد در نقاط مختلف استان و همجواری با کشورهای پاکستان و افغانستان و تردد بومیان باشد. نتیجه تحقیق حاضر، حاکی از موجود بودن هر دو فرم لیشمانیوز جلدی آنتروپونوتیک و زئونوتیک در استان سیستان و بلوچستان می‌باشد که از دلایل آن میتوان به ورود اتباع بیگانه غیرمجاز به کشور اشاره نمود. با توجه به این که این بیماری توسط پشه‌های خاکی از فرد مبتلا به سالک منتقل می‌شود، حضور این افراد که بدون هیچ گونه کنترل بهداشتی وارد کشور می‌شوند، در انتشار این بیماری مؤثر است به طوری که حدود ۱۹ درصد موارد مبتلا در سال‌های اخیر در منطقه مورد مطالعه را اتباع بیگانه تشکیل می‌دهند همچنین در شرح حال این بیماران سابقه سفر به کانوهای آلوده کرمان ویزد و بندر عباس وجود دارد. شناسایی و

نتیجه تحقیق، حاکی از موجود بودن هر دو فرم لیشمانیوز جلدی آنتروپونوتیک و زئونوتیک در استان سیستان و بلوچستان می‌باشد که از دلایل آن میتوان به ورود اتباع بیگانه غیرمجاز به کشور اشاره نمود. با توجه به این که این بیماری توسط پشه‌های خاکی از فرد مبتلا به سالک منتقل می‌شود حضور این افراد که بدون هیچ گونه کنترل بهداشتی وارد کشور می‌شوند در انتشار این بیماری مؤثر است به طوری که حدود ۱۹ درصد موارد مبتلا در سال‌های اخیر در منطقه مورد مطالعه را اتباع بیگانه تشکیل می‌دهند. همچنین در شرح حال این بیماران سابقه سفر به کانوهای آلوده کرمان ویزد و بندر عباس وجود داد. در تحقیق حاضر، با توجه به همخوانی نتایج sequencing DNA با PCR-RFLP و نیز ایجاد الگوی بانندی مربوط به لیشمانیا در مورد تمام نمونه‌ها، به نظر میرسد که PCR انجام شده، اختصاصی عمل کرده و احتمال پاسخ مثبت کاذب در آن ناچیز است. در مطالعه‌ی به عمل آمده توسط فولادی و همکاران که در منطقه مرزی میرجاوه به عمل آمده است لیشمانیا ماژور به عنوان عامل ۱۰۰ درصد بیماری گزارش گردیده است. نتایج حاصل از این تحقیق وجود لیشمانیا تروپیکا در این منطقه را نیز اثبات می‌نماید (۳). در مطالعه تقفی پوروهمکاران در بخش مرکزی استان قم با استفاده از تکنیک PCR-RFLP، نمونه‌های انسانی و یک نمونه از جونده گونه مریونس لیبیکوس برای تعیین هویت انگل لیشمانیا مورد آزمایش قرار گرفته و مشخص شد که انگل موجود در لام‌های انسانی و جونده،

می‌تواند در طی ۲۴ ساعت علاوه بر تشخیص لیشمانیوز، نوع گونه انگل را تعیین هويت نمود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از دانشگاه زابل و دانشگاه علوم پزشکی زاهدان و نیز آقای مهندس حمید ملک ریسی تشکر و قدردانی می‌شود.

تعیین هويت انگل لیشمانیا با استفاده از روش مولکولی PCR-RFLP در لام‌های رنگ آمیزی شده باگیمسا در نمونه‌های انسانی، روش مناسب و به صرفه‌ای است. مزایای این روش این است که بدون انجام تعیین توالی ژن‌ها، تشخیص گونه‌های انگل لیشمانیای مولد بیماری امکان پذیر خواهد بود. بنابراین این تکنیک PCR-RFLP در کنار سایر روش‌ها مثل تزریق انگل به حیوان آزمایشگاهی، کشت انگل و تست‌های سرولوژی روش مفیدی خواهد بود. ضمن این که تکنیک حساسیت و ویژگی بالا بوده و

منابع

- ۱- بقایی، ا، سیدان جاسبی، ا، آخوندی، م، میرزایی، ه، دهنام، ا. ۱۳۹۱. تشخیص میکروسکوپی و تعیین هويت مولکولی انگل لیشمانیا با هدف قرار دادن ژن ITS-rDNA در بیماران مشکوک به لیشمانیوز جلدی در استان فارس. مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد. جلد ۲۰. شماره ۴. ص ۴۷۳-۴۶۴.
- ۲- شیرزادی، م. ۱۳۹۱. راهنمای مراقبت لیشمانیوز جلدی (سالک) در ایران. وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی معاونت بهداشت مرکز مدیریت بیماری‌های واگیر.
- ۳- فولادی ب، شریفی ا، ابراهیم زاده، ع، هاشمی شهری، س، مرادقلی، ح، سرابندی نو، ا، فضایی، ا. ۱۳۸۶. مقایسه روش PCR مستقیم با روش‌های میکروسکوپی و کشت *in vitro* برای تشخیص لیشمانیوز جلدی. جلد ۹. شماره ۳. ص ۱۸۱-۱۸۹.
- 4- Dowlati, Y., 1996. Cutaneous leishmaniasis: Clinical aspect. *Clinics in Dermatology*, 14(5):425-431.
- 5- Dowlati, Y., Firooz, A., 1997. Leishmaniasis (letter). *Journal of the American Academy of Dermatology*, 37(1):139-40.
- 6- De Bruijn, M.H., Barker, D.C., 1992. Diagnosis of New World Leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Tropica*, 52(1): 45-58.
- 7- Eisenberger, C.L., Jaffe, C.L., 1999. Leishmania: identification of Old World species using a permissively primed intergenic polymorphic polymerase chain reaction. *Experimental Parasitology*, 91(1): 70-77.
- 8- Harris, D.J., Crandall, K.A., 2000. Intra-genomic Variation within ITS1 and ITS2 of Freshwater Crayfishes (Decapoda: Cambaridae): Implications for Phylogenetic and Microsatellite Studies. *Molecular Biology and Evolution*, 17(2), 284-291.
- 9- Hassan Abadi, D., Gholam Rezaei, Y., Najafi, A., Alifarja, S., 2018. Investigating and analyzing the system of divisions in Iran with emphasis on scientific and geographical variables. *Geography*, 29(1), 277-298.
- 10- Lainson, R., Shaw, J.J., 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. *The Leishmaniasis in biology and medicine*. Orlando: Academic Press, 120-8.
- 11- Moin-Vaziri, V., Depaquit, J., Yaghoobi-Ershadi, M.R., Oshaghi, M.A., Derakhshandeh-Peykar, P., Ferté, H., 2007. Intraspecific variation within *Phlebotomus sergenti* Parrot (1917) (Diptera: Psychodidae) based on mtDNA sequences in Islamic Republic of Iran. *Acta Tropica*, 102(1): 29-37.
- 12- Marfurt, J., Niederwieser, I., Makia, N.D., Beck, P., Felger, I., 2003. Diagnostic genotyping of old and new world *Leishmania* species by PCR-RFLP. *Parasitology*, 46(2): 115-24.
- 13- Mohebbali, M., Javadian, E., Yaghoobi-Ershadi, M.R., Akhavan, A.A., Hajjaran, H., Abaei, M.R., 2004. Characterization of *Leishmania* infection in rodents from endemic areas of the Islamic Republic of Iran. *Eastern Mediterranean Health Journal*, 10(4-5): 591-9.

- 14 - Nadim, A., Tahvildar-Bidruni, G.h., Farshian, M., Heydari, M., Abadi, A.A., 1973. Differentiation of *Leishmania tropica major* from *Leishmania tropica minor* by inoculation to laboratory animals. Iranian Journal of Public Health, 2(2):115-18.
- 15- Nadim, A., Seyedi-Rashti, M.A., 1971. A brief review of the epidemiology of various types of leishmaniasis in Iran. Acta Medica Iranica, 14(2): 99-106.
- 16- Parvizi, P., Mauricio, I., Aransay, A. M., Miles, M. A. , Ready, P. D., 2005. First detection of *Leishmania major* in peridomestic Iranian sandflies: comparison of nested PCR of nuclear ITS ribosomal DNA and semi-nested PCR of mitochondrial DNA. Acta Tropica 93, PP:75-83
- 17- Pearson, R.D., De Queiroz Sousa, A., Jeronimo, S.M.B., 2001. *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, 283-45.
- 18- Russell, R., Iribar, M.P., Lambson, B., Brewster, S., Blackwell, J.M., Dye, C., 1999. Intra and inter-specific microsatellite variation in the *Leishmania* subgenus *Viannia*. Molecular and Biochemical Parasitology, 103(1): 71-7.
- 19- Sidney, N.K., Shoshana, F., Arieh, I., 1999. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis. Clinics in Dermatology, 17(3):257-60.
- 20- Van Eys, G.J., Schoone, G.J., Kroon, N.C., Ebeling, S.B., 1992. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. Molecular and Biochemical Parasitology, 51(1): 133-42.
- 21- Victor 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.
- 22- Wislon, S.M., 1995. DNA-based methods in the detection of *Leishmania* parasite: field applications and practicalities. Annals of Tropical Medicine & Parasitology, 89(1):95-100.
- 23- Saghafipour, A., Rassi, Y., Abai, M.R., Oshaghi, M.A., Yaghoobi, Arshadi, M.R., Mohebbi, M., et al. 2012. Identification of *Leishmania* species in patients and reservoir rodents using PCR-RFLP in the central county of Qom province in 2010. Arak University of Medical Sciences Journal; 15(6): 1-10.
- 24- Vaeznia, H., Dalimi, A., Sadraei, J., Pirstani, M. 2009. Determination of *Leishmania* species causing cutaneous leishmaniasis in Mashhad by PCR-RFLP method. Archives of Razi; 64(1):39-44.
- 25- Mohammadi Azni S, Rasi Y, Oshaghi M A, Yaghoobi Ershadi M, Mohebbi M, Abaie M, et al . 2011. Diagnosis and Characterization of *Leishmania* Species in Patients and Rodents Giemsa-Stained Slides by PCR-RFLP in Damghan District, Iran. Avicenna Journal of Clinical Medicine; 17 (4):5-9.

***ITS-rDNA* and molecular typing of *Leishmania* spp. in suspected patients with cutaneous leishmaniasis in Sistan and Balochestan province, Iran**

Zare-zadeh A.¹, Motlleb Gh.R.¹, Mirahmadi H.² and Salimi Khorashad A.R.³

¹ Dept. of Biology, University of Zabol, Zabol, I.R. of Iran

² Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, I.R. of Iran

³ Dept. of Parasitology and Mycology, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, I.R. of Iran

Abstract

Leishmaniasis is a parasitic disease caused by *Leishmania* species. The early diagnosis focused on clinical symptoms and direct observation of the parasites. Molecular methods are more sensitive than the direct microscopy. The identity of the species in Sistan-Baluchistan province has not been taken yet. *ITS-rDNA* was used to detect the species of *Leishmania* in patients from Sistan-Baluchistan province using molecular methods. This study was conducted during 2014-2015. Positive smear samples (82) were collected for molecular studies. The parasites were inoculated in N.N.N culture (with RPMI-1640 medium and 10% fetal calf serum) for rapid proliferation. After DNA extraction, the PCR-RFLP was carried out to determine the *Leishmania* species. SPSS and Multalin software were used to analyse the results. Forty six (56%) and 36 patients (44%) were diagnosed *Leishmania major* and *Tropica* respectively. The dominant species in the city of Chabahar and Mirjaveh were *Leishmania tropica* and *Leishmania major* respectively. In the central region of the province, both *leishmania major* and *tropica* are responsible for the disease. The results of this study indicated that both forms of *L. major* and *L. tropica* were identified in Sistan and Balochestan Province in Iran, which could be due to unlawful entry from Pakistan and Afghanistan. PCR-RFLP has high sensitivity for the diagnosis of leishmaniasis and rapid species identification of the parasites.

Key words: *ITS-rDNA*, *Leishmania major*, *Leishmania tropica*, PCR-RFLP