Arch

4th International Conference on Agricultural Sciences Medicinal Plants and Traditional Medicine
CINVU
Kosar University
COMSTECH Inter-Islamic Network on Virtual Universities
KOSAR UNIVERSITY
September 20, 2021 Tbilisi - Georgia

شناسایی مولکولی گونه های لیشمانیازیس جلدی با استفاده از ژن kdna در شهرستانهای چابهار و کنارک

حمید ملک رئیسی[۱] ، فرزانه الله دینیان[۲]، غلام رضا مطلب[۳]

۱-دانش آموخته کارشناسی ارشد، رشته ژنتیک مولکولی، دانشگاه زابل

۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد، رشته سم شناسی پزشکی،دانشگاه ازاد اسلامی، واحد شهرضا

۳-استادیار، گروه زیست شناسی ، دانشگاه زابل

چکیده

لیشمانیوز جلدی یکی از بیماریهای شایع انگلی است که در بسیاری از مناطق ایران به صورت آندمیک می باشد. و یکی از مسایل مهم بهداشتی در ایران محسوب می‌شود. به همین جهت انواع گونه های لیشمانیوز در شهرستان های چابهار وکنارک مورد بررسی قرار گرفت. گونه های مختلفی از لیشمانیا وجود دارند از جمله لیشمانیا تروپیکا،لیشمانیا ماژور ولیشمانیا دونوانی که باعث ایجاد زخم های عمیق بر روی اندام های بدن از جمله سر وصورت می شوند. تعیین گونه این انگل برای کنترل جلو گیری از انتشار انگل بسیار مهم می باشد. اگر چه از علایم اپیدمیولوژیکی وکلینیکی پی به وجود بیماری می بریم ولی به علت اشکال مشابه فرم های اماستیگوت وپرو ماستیگوت در گونه های مختلف انجام تست مولکولی PCR جهت تشخیص افتراقی ضروری می باشد. این تحقیق با تکنیک PCRدرمرکز تحقیقات بیمارستان بو علی زاهدان انجام شد و۱۲ماه به طول انجامید..

واژگان کلیدی: لیشمانیا تروپیکا- لیشمانیا ماژور- ژن kdna

www.SID.ir

Arch

مقدمه

لیشمانیوز یکی از بیماری های شایع انگلی است که با عوامل مختلف لیشمانیا، مانند لیشمانیا تروپیکا لیشمانیا ماژور و لیشمانیادو نوانی ایجاد می شود آقای کونیگهام در سال ۱۸۸۵برای اولین بار وجود تک باخته انگلی را در زخمهای جلدی گزارش کرد (Talari et al., 1382). لیشمانیوز یکی از مهمترین بیماری‌های نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری است که در انسان به اشکال جلدی (سالک) احشایی(کالاآزار) و جلدی مخاطی ظاهر می‌شود که در ایران دو نوع جلدی و احشائی شایع می‌باشند و نوع جلدی مخاطی تا کنون از ایران گزارش نشده است (Mohebali et al.,2004). لیشمانیا توسط گونه های مختلفی ازپشه های خاکی به انسان منتقل می شوند و به اشکال مختلفی در بدن انسان و پشه خاکی مشاهده می شوند. لیشمانیوز یکی از مهم ترین بیماری منتقله از بندپایان به انسان است که از معضلات مهم بهداشتی در بسیاری از نقاط دنیا محسوب می‌شود. هرساله تعداد زیادی از ساکنین مناطق آندمیک به این بیماری مبتلا می شوند (Nadim et al.,2008, Ardahali et al.,1994) . از ۸۸ کشور دنیا بیماری لیشمانیوز گزارش شده است که۸۲٪ (۷۲کشور)، جزء کشورهای در حال توسعه می باشد. عفونت با انگل لیشمانیا می تواند منجربه تظاهرات کلینیکی متعددی در میزبان مبتلا بشود ازجمله باعث ایجاد عفونت جلدی،جلدی منتشر ، جلدی مخاطی عفونت احشائی میزان شدت عفونت حاصله از انگل لیشمانیا بستگی به عوامل مختلفی از جمله نوع لیشمانیا وسیستم میزبان دارد.دوره کمون بیماری می‌تواند به مدت چند روز باشد و یا تا سال ها طول بکشد ،عفونت و علائم بیماری گاهی اوقات تا چندین سال ادامه می یابد. لیشمانیوز جلدی در ابتدا از محل نیش پشه به صورت یک ندول کوچک ظاهر می شود و بعد از ۲هفته تا ۶ ماه به یک زخم عمیق تبدیل می شود .(Reithinger et al.,2007).

شناسایی گونه های لیشمانیا برای مبارزه با ناقلین وکنترل بیماری و مخازن ارزشمند می باشد. همچنین تشخیص بیماری برای درمان سریع نیز حائز اهمیت است. در طبق بررسی ها بیشترین موارد یافت شده لیشمانیوز، مربوط به گونه لیشمانیا ماژور و لیشمانیا تروپیکا می باشد. میزان بروز بیماری از سال ۱۳۶۲ تا ۱۳۷۸حدود ۲۰ تا ۴۰ مورد در صد هزار است (Rodrigues, E et al.,2002). تشخیص عفونت ها یکی از محدودیت های اصلی در کنترل بیماری هاست. روش‌های میکروسکپی و کشت، اغلب غیر حساس و متغیر بوده و موارد زیادی از لیشمانیوز پوستی به علت پراکندگی و کمی تعداد انگل در نمونه ، همچنین عدم مهارت لازم در تشکیل انگل ، نمی توانند شناسایی شوند. بنابراین، روش تشخیصی حساسی برای رفع این مشکل مورد نیاز است(Reithinger et al.,2007). این بیماری به صورت بومی در اکثر نقاط جهان گزارش شده است. گونه های دنیای قدیم باعث زخم های خود محدود شونده می‌شوند وگونه های دنیای جدید علائم بالینی وسیع تری به نام لیشمانیوز پوستی- مخاطی را ایجاد می کنند (Schneider, P et al.,2005). به طور متداول تشخیص لیشمانیوز جلدی ،مبتنی بر روش های میکروسکوپی یا کشت انگل لیشمانیا از نمونه های پوست یا آسپیره از زخم‌ها می‌باشد که این روش ها غیر حساس و کشت انگل مستلزم وقت طولانی است (Schallig, H. D., & Oskam, L. 2002) دردهه های اخیر روش های PCR برای شناسایی انگل لیشمانیا طراحی و توسعه یافته و در کشور

www.SID.ir

Arch

هایی که PCR قابل دسترسی است ، روش ابزار تشخیصی مهمی هستند اما اکثر روش هایPCR مبتنی بر تکثیر DNA است که اطلاعاتی در مورد زنده بودن پاتوژن فراهم نمی کند DNAانگل‌های لیشمانیا می تواند در زخم های بیماران مبتلا به لیشمانیوز حتی ماه‌ها پس ازدرمان بالینی جدا شوند (Mendonça, M. et al.,2005). اصولا روش‌هایی که قادر به شناسایی انگل زنده هستند ،این امکان را فراهم می‌سازند که محقق ، ارزیابی اثر درمانی داروها را به خوبی تحت نظارت قرار دهد. در حال حاضر، برای ارزیابی داروها به دلیل اختلاف در گونه های لیشمانیا مشکلاتی از قبیل اشکال مختلف بالینی بیماری، عدم پاسخ صحیح به درمان و مقاومت دارویی مشاهده می‌شود (Croft, S. L. 2001). نتایج مطالعات نشان داده بیشترین مبتلایان لیشمانیوز را گروه سنی زیر ۵ سال می باشد که مطالعات انجام شده با مطالعات مسگریان و همکاران در استان گلستان مطابقت دارد (Yaghoobi et al.,1997 ,mesgarian et al.,2007). در بررسی مسگریان و همکاران بیشترین موارد ابتلا در گروه سنی زیر ۱۰ سال گزارش شده است. و موردی از ابتلا به سنین بالای ۵۰ سال دیده نشده است. اگر چه الگوی سنی ابتلا به سالک در کانون های مختلف کشور بر اساس میزان آندمیسیته بیماری در یک منطقه می باشد (Yaghoobi et al.,2001). فخار و همکاران در بررسی خود بر روی بیماران مبتلا به سالک در شیراز بیان کردند که موارد بیماری مربوط به ماه آبان با۳۱/۷ درصد وکمترین موارد مربوط به اردیبهشت ماه(۰/۴) می باشد .در مطالعه مسگرایان و همکاران در استان گلستان نیز بین فصل مراجعه و تعداد موارد بیماری ارتباط معنی داری گزارش شده است که بر اساس آن فصل پاییز بیشترین و فصل بهار کمترین موارد ابتلا رابه خود اختصاص داده است نتایج بررسی ها نشان می دهد که اختلاف معنی داری بین ابتلا بین جنس مذکر و مونث وجود ندارد (fakhar et al.,2010).

استفاده از گسترش های تهیه شده از ضایعات فعال جهت آزمایشات مولکولی دارای مزایایی است که از آن جمله می توان به امکان تشخیص سریع ،سهولت در نمونه گیری و انتقال به آزمایشگاه ،استفاده از یک نمونه جهت آزمایش توام میکروسکپی و مولکولی و نیز امکان استفاده از گسترش های قدیمی اشاره کرد. همچنین از مهمترین مزایای آزمایشات مولکولی بر پایه گسترش مستقیم ،امکان تعیین هویت تمام گونه ها یا سویه های موجود در یک نمونه است (Luis et al.,1998;Valizadh et al.,2004) کنترل بیماری لیشمانیوز در مناطق بومی نیازمند آگاهی از اکولوژی و اپیدمیولوژی انگل ،میزبان مخزن و نیز ناقل بیماری دارد .در این راستا شناسایی مخازن و جستجوی ناقلان آلوده یکی از مشکلات اساسی مسئولین کنترل بیماری محسوب می شود. یافتن پشه‌های خاکی آلوده به انگل ،گامی اساسی در شناسایی گونه‌های ناقل و نیز پتانسیل انتقال بیماری در مناطق بومی است (Aransay et al.,2000) لیشمانیوز جلدی در ایران به دو شکل لیشمانیوز جلدی مرطوب، ناشی از لیشمانیوز ماژور و لیشمانیوز جلدی خشک ، ناشی از لیشمانیا تروپیکا می باشد.کانون های هایپر آندمیک لیشمانیوز جلدی مرطوب در کشور ایران در استان‌های اصفهان،گلستان،خوزستان،ایلام ، بوشهر و سمنان گزارش شده است ،در حالی که لیشمانیوز جلدی خشک در بسیاری از شهرهای بزرگ از جمله تهران،شیراز،مشهد و بم به شکل آندمیک وجود دارد(tashakori et al .,2003 tashakori et al.,2006). هر چند از نظر کیلینیکی بین دو شکل بیماری تفاوت های واضحی وجود دارد ولی لیشمانیوز جلدی مرطوب و خشک علاوه

www.SID.ir

Arch

بر شکل تیپیک، موجب بروز طیف وسیعی از ضایعات می‌شود که از عفونت‌های بدون علامت تا ضایعات بسیار وسیع پوستی را شامل می گردد.(belli et al.,1998; berzunza et al.,2002). تعیین مشخصات گونه های لیشمانیا ، برای تشخیص صحیح و پیشگیری از این بیماری، همچنین برای تصمیم گیری در مورد درمان و اعمال روش‌های کنترل بیماری بسیار حائز اهمیت است (hajjaram et al.,2004 rotureau et al.,2006) در دهه های گذشته انگل های لیشمانیا به طور مستقیم از طریق بررسی مورفولوژی لام میکروسکپی نمونه های بالینی ،توزیع جغرافیایی ایزوله ها به خصوص در مناطق آندیک ،بیماری‌زایی برای میزبان و الگوی رشد در محیط کشت تعیین هویت و طبقه بندی می شدند. این روش ها فاقد دقت لازم بوده است،به عنوان مثال ممکن است چندین گونه لیشمانیا به طور همزمان در یک منطقه موجود باشند(marfurt et al.,2003). در روش‌های مذکور با توجه به روش های مولکولی و سایر روش های دقیق ،امروزه از اولویت خارج شده ودر حال حاضر تحلیل ایزو آنزیم ها و استفاده از DNA انگلی یک استاندارد طلایی برای متمایز کردن گونه های لیشمانیا محسوب می گردند (schonian et al.,2003) . تعیین گونه های لیشمانیا بر اساس علائم ونشانه های بالینی می تواند مشکل آفرین باشد ،به عنوان مثال لیشمانیوز جلدی به دلیل اشکال بالینی متنوع به تشخیص افتراقی نیاز دارد (bailey et al.,2007). معتضدیان و همکاران در سال ۲۰۰۲ با استفاده از روش PCR انگل لیشمانیا را مورد شناسایی قرار دادند؛ در این تحقیق با استخراج DNA از گسترش های رنگ آمیزی شده با گیمسا وانجامPCR با پرایمر های اختصاصی در تشخیص لیشمانیازیس پوستی پرداخته شد (Motazedian et al.,2002). در مورد سالک نوع شهری و روستایی روش های سرولوژی کارایی چندانی ندارند. تشخیص لیشمانیا هر چند با فراهم نمودن گسترش از زخم بیمار ورنگ آمیزی گیمسابه راحتی امکان پذیر است ، اما در مواردی که زخم مزمن بوده وشمار انگل اندک باشد، تشخیص را مشکل می کند (AL-jawabereh et al.,2006;Motazedian et al.,2002). مطالعات مختلف نشان می دهد که، روش های PCR مبتنی بر DNA کنیتو پلاست انگل لیشمانیا روش حساسی در تشخیص بیماری به ویژه در موارد مزمن می باشد.(Fakhr et al.,2010;Pourmohammadi et al.,2010). فخار و همکاران در بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه گروه انگل شناسی دانشکده پزشکی شیراز با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز ،بر روی تعداد ۶۲ گسترش مستقیم که جسم لیشمن در آن یافت نشده بود،۳۵ مورد (۵۶/۴درصد) از آن ها DNA انگل شناسایی نمودند Fakhr et al.,2010). کرمیان و همکاران در انجام روش PCR اختصاصی گونه با استفاده از پرایمر های اختصاصی بیماران مبتلا به سالک ،این روش را در شناسایی موارد غیر تیپیک بسیار کار آمد تر از روش مستقیم اعلام نمودند ضمنا در مطالعه آن‌ها با استفاده از پرایمر های اختصاصی در شناسایی گونه انگل در موارد غیر تیپیک بیماری ۱۰۰درصد بوده است (Karamian et al.,2008).

رویکرد جدید در توسعه واکسن علیه لیشمانیوز استفاده از آنتی ژن های خالصی است که بتواند ایمنی سلولی را فعال نموده ومنجر به تولید اینترفرون گاما گردد(Mansueto et al.,2007). طبق مطالعات مشخص شده است که

www.SID.ir

Arch

پروتئین‌های اماستیگوتی توانایی بالاتری در تحریک سیستم ایمنی داشته اند چرا که مرحله اماستیگوتی انگل لیشمانیا نسبت به سامانه ایمنی مقاوم بوده و باعث استقرار عفونت در بدن انسان می شود (joshi et al.,2007).

از آنجایی‌که اولین گام در برنامه ریزی جهت کنترل و مبارزه با بیماری، تعیین مشخصات دقیق عامل بیماری است، آگاهی از مخزن موجود در هر منطقه و میزان آلودگی آن ها، شناسایی گونه ها و لیشمانیا در مخازن و آگاهی از تغییرات ژنتیکی آن ها می تواند نقش اساسی در برنامه ریزی،کنترل و پیش گیری از بیماری داشته باشد (Nadim et al.,2008). در سال های اخیر از روش های ملکولی به ویژه PCR در سطح وسیعی برای تعیین آلودگی استفاده می شود تا به حال از بخش مختلفی از ژنوم انگل مانند s-rna۱۸ و its وkdna استفاده شده است. طبق مطالعات انجام شده ۵ درصد بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی در نتیجه مهاجرت فرم اماستیگوت انگل لیشمانیا تروپیکا از پوست بوسیله غدد لنفاوی ویا خون به نواحی حلق وبینی وایجاد فرم لیشمانیوز جلدی مخاطی می شود. طبق گزارشات عفونت همزمان لیشمانیوز جلدی ماژور ولیشمانیا تروپیکا موجب ایجاد بیماری نادر لیشمانیوز جلدی مخاطی در کشورهای افغانستان ،عربستان و همچنین درکشور سودان به صورت تگ گیر شده است (Garcia et al., 2007). طبق مطالعات اولیه در استان فارس در جنوب ایران عفونت همزمان لیشمانیوز جلدی تروپیکا ولیشمانیوز جلدی ماژور مشاهده شده است (Asgari Q, et al. 2007).

روش تحقیق

دستگاه‌های مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱ . دستگاه های مورد استفاده

نام دستگاه	مدل	نام شرکت سازنده	کشور سازنده
ترمو سایکلر	Gradiant	Eppendorf	آلمان
فریزر۲۰-	آزمایش	آزمایش	ایران
ژل داک	2100	Unico	آمریکا
ترازوی دیجیتال	V200	AccuLAB	آلمان
اتو کلاو	AV25	کاوش طب	ایران
بن ماری	NB-301	Memmert	آمریکا
تانک الکتروفورز	E0203	Labnet	تایوان
اسپین	Micro spin	Qiagene	آمریکا
ورتکس	S0200-230 V-EV	Labnet	تایوان

www.SID.ir

هود	کلاس II	Kaveh	ایران
یخچال ٤ درجه	-	الکترو استیل	ایران
سانتریفیوژ	22331	Eppendorf	آلمان
انکو باتور	D-6405	Heraeus	آمریکا

مواد مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۲ ذکر شده است.

جدول۲. مواد مورد استفاده

نام وسیله یا دستگاه	شرکت سازنده یا فروشنده	کشور	مصرفی یا غیر مصرفی	آیا در ایران موجود است؟	تعداد لازم	قیمت واحد ریال	قیمت کل
اتانول	مرک	آلمان	مصرفی	بله	۵ لیتر	۱۰۰۰۰	۵۰۰۰۰۰
لام		ایران	مصرفی	بله	۱۰بسته	۱۰۰۰۰۰	۱۰۰۰۰۰۰
رنگ گیمسا	ندای فن	ایران	مصرفی	بله	۲لیتر	۱۲۵۰۰۰۰	۱۲۵۰۰۰۰
Master mix	Amplican	دانمارک	مصرفی	بله	۵ویال	۱۰۰۰۰۰	۵۰۰۰۰۰
پرایمر	پیشگام	ایران	مصرفی	بله	۴ویال	۲۵۰۰۰۰	۱۰۰۰۰۰۰
اگارز	پیشگام	ایران	مصرفی	بله	۱ قوطی	۴۰۰۰۰۰	٤۰۰۰۰۰
میکروتیوب 0.5ml	کیاژن	ایران	مصرفی	بله	۳ بسته	۳۵۰۰۰۰	۱۰۵۰۰۰۰
پروتئیناز 25mg K	سیناژن- fermentas	ایران	مصرفی	بله	۳ ویال	۳۰۰۰۰۰	۹۰۰۰۰۰
رکیت استخراج DNA	Ferments	ایران	مصرفی	بله	۲عدد	۲۵۰۰۰۰۰	۵۰۰۰۰۰۰
بر چسب		ایران	مصرفی	بله	۱۰ بسته	۱۰۰۰۰	۵۰۰۰۰
ژل رد	پیشگام	ایران	مصرفی	بله	اویال	۲۵۰۰۰۰	۲۵۰۰۰۰
پنبه	سینا ژن	ایران	مصرفی	بله	۱۰ بسته	۱۵۰۰۰	۱۵۰۰۰۰
DNA ladder	پیشگام	ایران	مصرفی	بله	۱ ویال	۲۵۰۰۰۰	۲۵۰۰۰۰

www.SID.ir

Arch

DNA lddder bp۱۰۰	پیشگام	ایران	مصرفی	بله	اویال	۲۵۰۰۰۰	۲۵۰۰۰۰

آزمایش نیز به این صورت انجام شد که ابتدا هشتاد نمونه افراد مشکوک به ضایعات جلدی در مراکز بهداشتی ودرمانی چابهار و کنارک ، توسط همکاران طرح (به طور اخص توسط دانشجوی همکار طرح)جمع آوری شد. از نمونه های زخم ایجاد شده بر روی قسمت های مختلف بدن به خصوص قسمت های دست و صورت پس از استریل کردن زخم توسط تیغ بیستوری در زخم شکاف ایجاد کرده ومحتویات زخم را بر روی لام منتقل کرده و وسپس نمونه های جمع آوری شده به آزمایشگاه سیستماتیک مولکولی مرکز تحقیقات بیمارستان بوعلی زاهدان منتقل شدو سپس نمونه های فیکس شده با متانول، با رنگ گیمسا رنگ آمیزی شده و زیر میکروسکوپ نوری با درشت نمایی هزار برابر از نظر وجود جسم لیشمن مورد بررسی قرار گرفت و بعد از آن تک تک نمونه ها از نظر میزان و تعداد انگل (جسم لیشمن) با استفاده از میکروسکوپ نوری و درشت نمایی X1000 به دقت مورد بررسی قرار گرفت و گسترش های تهیه شده براساس تعداد انگل طبق جدول ۳ درجه بندی شد.

جدول۳. نحوه شمارش رتبه ای و میزان مثبت بودن لام ها در گسترش های رنگ آمیزی شده با گیمسا

Parasit index	Degree/intensity
Amastigot /1000 field	**O**
1-10 amastigot /1000 field	**1+**
1-10 amastigot / 100 field	**2+**
1-10 amastigot /10 field	**3+**
1-10 amastigot/ 1field	**4+**
10-100 amastigot / 1field	**5+**
>100 amastigot /1field	**6+**

برای استخراج DNA از دو روش استفاده می شود که این روش ها عبارتند از :

۱- روش فنل کلرو فرم ۲- روش استخراج DNA به روش کیت

۲-۴-۱:روش استخراج DNA با استفاده از کیت

در این تحقیق استخراج با کیت Dna BaBio انجام شده که شامل مراحل زیر است

www.SID.ir

Arch

۱-توسط تیغ بیستوری سطح لام برش داده شده و محتویات لام را داخل میکرو تیوب قرار داده شد و آون و بن ماری و همچنین بافر رها سازی دردمای۵۶ درجه تنظیم شد و برای اطمینان از درستی استخراج و عدم بروز آلودگی ،در حین کار عمل استخراج را روی یک نمونه منفی (آب مقطر تزریقی)هم انجام شد.و یک نمونه مثبت تائید شده جهت کنترل مثبت نیز به نمونه ها اضا فه شد و سپس پنجاه عدد تیوب ۱/۵ لیتری سترون را نامگذاری کرده ودر داخل هر تیوب۲۰ میکرولیتر پروتئین کیناز ریخته و بعد از آن ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه های مجهول در هر کدام از تیوب ها ریخته در مرحله بعدی ۲۰۰ میکرولیتر بافر اتصال به تیوب ها اضافه شد.و تیوب ها به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس شد و بعد از آن در دمای ۵۶ درجه به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد و سپس تیوب ها به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفیوژ شده و در مرحله بعدی ۲۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق اضافه کرده و به مدت ۱۰ ثانیه دوباره تیوب ها ورتکس شدند و سپس ستون های اتصال قرار گرفته بر روی تیوب را برداشته و محتویات هر تیوب را داخل ستون منتقل کرده و بعد از آن ستون ها در ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند و ستون ها را یکی یکی به تیوب های ۲میلی لیتری جدید منتقل شد و سپس ۵۰۰ میکرو لیتر بافر شستشوی شماره یک به تیوب اضافه شد دوباره به مدت یک دقیقه در دور ۸۰۰۰ ساتنریفوژ شدند .ودر مرحله بعدی ستون ها را به تیوب های ۲ میلی لیتری جدید منتقل شدند و بعد از آن ۵۰۰ میکرو لیتر بافر شستشوی شماره دو به ستون اضافه شد و ستون ها در دور۱۴۰۰۰به مدت سه دقیقه سانتریفوژ شدند. و سپس ستون ها به تیوب های ۱/۵ لیتری منتقل شدند و در مرحله بعدی۱۰۰ میکرولیتر بافر رها سازی را داخل ستون ریخته ودرب آن‌ها رابسته وحدود ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد.در نهایت ستون ها را در دور ۱۳۰۰۰ به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ شدند. ستون ها دور انداخته شدند و محلول زیر ستون حاوی DNA استخراج شده می باشد .(mohammadi *et al*., 2015).

برای تعیین میزان DNA استخراج شده از دو روش تعیین غلظت با دستگاه اسپکتروسکوپی جذب UV و تخمین غلظت نمونه های DNA از روش الکتروفورز استفاده می‌شود. و برای مشاهده کیفیت DNA ژنومی استخراج شده و محصولات حاصل از واکنش PCR از روش ژل الکتروفورز یا ژل آگار ۱ درصد استفاده شد.

- آماده سازی محلول هم به این صورت انجام شد که پودر پروتئناز k را در۱/۲۵ میلی لیتر آب فاقد نوکلئاز (آب تزریقی) حل شد و به صورت تقسیم شده در فریزر ۲۰- درجه قرار داده شد.
- به بافر شستشوی شماره یک ۱۲cc اتانل مطلق اضافه شد.
- به بافر شستشوی شماره دو ۴۸cc اتانل مطلق اضافه شد.

این اعمال برای اولین بار که کیت باز شد انجام شده است.

قبل از انجام الکتروفورز ،برای رنگ آمیزی ومشاهده DNA، ژل رد استفاده شد .ژل رد با خاصیت فلئورسانس و توانایی جایگیری درون رشته های DNA و به کمک دستگاه Gel Doc (دستگاه عکس برداری از ژل) و نور UVرشته های DNA رشته های رنگ شده را قابل مشاهده می کند. غلظت محلول ذخیره و پایه این ماده ۱۰mg/mlمی باشد . ودر ظرف دربسته و رنگی ،در دمای اتاق نگهداری گردید(hajarran et al.,2014) . **و** همچنین جهت طراحی پرایمر از

www.SID.ir

Arch

توالی ژن *kdna* با نام CSB2XF استفاده شد. و از نرم افزار Blast در پایگاه اینترنتی NCBI استفاده شد. پرایمر طراحی شده نیز از شرکت پیش گام تهیه گردید.

آماده سازی پرایمر های لیوفیلیزه طبق دستور شرکت سازنده انجام شد بدین صورت که به پرایمرها به مقدار مناسب آب مقطر دو بار تقطیر استریل اضافه گردید سپس پرایمر ها به مدت یک دقیقه ورتکس شده و ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و سپس در دمای اتاق نگهداری شد.و از این محلول اولیه رقت یک به ده تهیه و به عنوان محلول کاری استفاده شد سپس پرایمر های حل شده در ۲۰- درجه ذخیره گردید در جدول ۴ پرایمر های طراحی شده وشرایط دمایی بکار رفته و طول باند های تشکیل شده نشان داده شده است.

جدول٤. پرایمرهای استفاده شده در تست PCR

PCR step	Target	Primer name	Sequence
First step	KDNA	CSB2XF	5-CGAGTAGCAGAAACTCCCGTTA-3
		CSB2XR	5-ATTTTTCGCGATTTTCGCAGAACG-3
Second step	KDNA	LIR	5-TCGCAGAACGCCCCT-3
		13ZF	5-ACTGGGGTTGGTAAAATAG-3

برای آگاهی و دستیابی به دمای بهینه Annealing جهت انجام PCR با استفاده از یک نمونه DNA و جهت پرایمر های انتخابی برای هر یک از توالی ژن‌های مورد مطالعه، PCR شیب دمایی انجام گرفت.با آگاهی از دمای Annealing مناسب برای هر یک از جفت پرایمر ها کلیه نمونه های DNA استخراجی PCR شده و محصول تک باند با اندازه وکیفیت مورد نظر به دست آمد.

پس از استخراج DNA، ژن kdna به وسیله تست مولکولی PCR با استفاده از پرایمر های اختصاصی تکثیر شد در این تحقیق از دستگاه PCR استفاده کردیم و پس از بهینه کردن PCR سیکل‌های حرارتی زیر انتخاب شد ابتدا دستگاه ترموسایکلر را روشن کرده بعد میکروتیوب ها را در دستگاه قرار داده و برنامه ی دمایی مربوط به ژن kdna را تنظیم و دکمه‌ی شروع را فشار می‌دهیم . برای تکثیر ژن از برنامه دمائی زیر استفاده شد.

۱) ۹۵° c به مدت ۵ دقیقه (واسرشت رشته الگو)

۲) ۹۴°c به مدت ۳۰ثانیه (واسرشت رشته ساخته شده)

۳) ۵۹°c به مدت ۵۵ثانیه (دمای اتصال پرایمر)

۴) ۷۲°c به مدت 60 ثانیه (دمای مناسب جهت فعالیت آنزیم DNA پلیمراز)

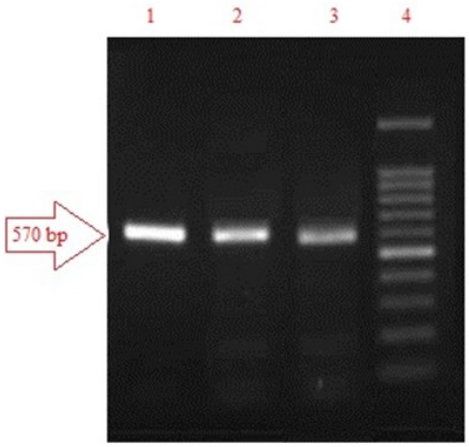
www.SID.ir

Arch

۷۲°c به مدت ۵دقیقه (برای اطمینان از ساخت کامل قطعات (saldarriga *et al*.,2016) .

یافته ها

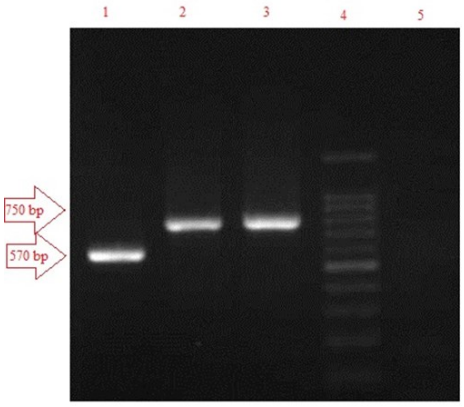
در مطالعات ژنتیک مولکولی، استخراج DNA ژنومی ، جزء اولین مراحل تحقیق می باشد که به وسیله چندین روش قابل انجام است .در پژوهش حاضر کلیه نمونه های ارسالی پس از استخراج DNA ژنومی ،کیفیت و غلظت نمونه ها با ژل آگارزو جذب نوری و با استفاده از دستگاه اسپکتو فوتو متر بررسی شد. تک باندها (شکل۱و شکل ۲) وجذب نوری ۱/۸مشاهده شده در این بررسی ، کیفیت وخلوص DNA استخراجی را نشان داد. در طی این مطالعه با توجه به غلظت DNA استخراجی ۱۰میکرولیتر از محلول DNA استخراجی مورد استفاده قرار گرفت وDNA های استخراجی در دمای۲۰- نگهداری شد. از مجموع ۸۰ نمونه ارسالی، ۵۰ نمونه مربوط به مراکز بهداشتی و درمانی شهرستان چابهار و۳۰ نمونه مربوط به مراکز بهداشتی و درمانی شهرستان کنارک بود.که از نمونه های ارسالی شهرستان چابهار ،۴۴ نمونه لیشمانیا تروپیکا و ۶ نمونه لیشمانیا ماژور ، و از ۳۰ نمونه ارسالی از شهرستان کنارک ۲۷ نمونه لیشمانیا تروپیکا و۳ نمونه لیشمانیا ماژور بود.



شکل ۱. نتایج حاصل از PCR ژنهای kdna لیشمانیا ماژور. لاین شماره ۱: باند ۵۷۰ bp مربوط به لیشمانیا ماژور به عنوان کنترل مثبت، لاین های شماره ۲ و ۳ : : باند570 bp مربوط به لیشمانیا ماژور به عنوان نمونه، لاین شماره ٤: لدر ۱۰۰ bp

www.SID.ir

Arch



.شکل ۲. نتایج حاصل از PCR ژن های kdna لیشمانیاتروپیکا. لاین شماره ۱: با ند 570 bp مربوط به لیشمانیاماژور به عنوان کنترل مثبت، لاین‌های شماره ۲ و ۳ : باند bp750 مربوط به لیشمانیا تروپیکا به عنوان نمونه

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به نتایجی که حاصل شد لیشمانیوز جلدی(سالک)که در منطقه جنوب سیستان و بلوچستان(شهرستان های چابهار وکنارک) به صورت آندمیک وجود دارد و تحقیق حاضر برای شناسایی گونه های لیشمانیوز جلدی شهری و روستایی انجام شده است. بعلت اینکه درمان بیماری لیشمانیوز جلدی بسته به نوع لیشمانیوز متفاوت است ،تشخیص افتراقی گونه های این انگل ضروری می نماید.بر این اساس از تعداد ۲۵۰ لام رنگ آمیزی شده با رنگ گیمسا، که مشکوک به لیشمانیوز جلدی بود و از زخم های بیماران مشکوک به لیشمانیوز جلدی جدا شده بود در حدود ۸۰ نمونه توسط آزمایش مولکولی PCR تعیین گونه شد. واز ۸۰ نمونه مثبت موجود ،مشخص شد که ۷۱ نمونه مربوط به لیشمانیوز شهری(لیشمانیا تروپیکا)و۹نمونه لیشمانیوز روستایی (لیشمانیا تروپیکا) بودکه این ارقام نشان می دهد که بیشتر نمونه های جدا شده از زخم های بیماران در جنوب سیستان وبلوچستان(شهرستان های چابهاروکنارک)مربوط به لیشمانیا تروپیکا یا لیشمانیوز شهری می باشد که می تواند دلایل مختلفی داشته باشد از جمله نزدیک بودن سگ ها به مناطق شهری باعث افزایش میزان لیشمانیوز جلدی شهری شده زیرا سگ یکی از عوامل مهم انتشار آلودگی به انسان می باشد و از سایر دلایل می توان به وجود افراد غیر بومی که از سایر شهرستان های ایران به این منطقه آمده اند و باعث انتشار آلودگی شده اند را می توان اشاره کرد. طی این تحقیق مشخص شد که گونه های لیشمانیای جلدی جدا شده در جنوب استان سیستان و بلوچستان با سایر نواحی استان متفاوت می باشد. ودراین تحقیق گونه جدیدی از انگل لیشمانیا یافت نشد.

www.SID.ir

Arch

منابع

طالاری صفر علی ،طالاری محمد رضا .تک یاخته شناسی پزشکی . کاشان انتشارات مرسل چاپ اول سال۱۳۸۲;صفحات ۱۴۵-۱۱۹.

Mohebali, 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. *EMHJ-Eastern Mediterranean Health Journal, 10 (4-5), 591-599, 2004*.

Nadim A, Javadian E, Mohebali M, Zamen- moemeni A. Leishmania and Leishmaniasis. 3rd ed. Tehran: Tehran Uneversity Publication Center 2008. Text in Persian 9-106

Ardahali S, Rezaei H, Nadim A. Leishmania and Leishmaniasis. 2nd ed. Tehran: Tehran Uneversity Publication Center; 1994. Text in Persian

Reithinger, R., Dujardin, J. C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., & Brooker, S. (2007). Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet infectious diseases*, *7*(9), 581-596.

Rodrigues, E. H., & Felinto de Brito, M. E. (2002). Mendonç a MG, Werkhäuser RP, Coutinho EM, Souza WV, et al. Evaluation of PCR for diagnosis of American cutaneous leishaniasis in an area of endemicity in northeastern Brazil. *J Clin Microbiol*, *40*, 3572-6.

Schneider, P., Wolters, L., Schoone, G., Schallig, H., Sillekens, P., Hermsen, R., & Sauerwein, R. (2005). Real-time nucleic acid sequence-based amplification is more convenient than real-time PCR for quantification of Plasmodium falciparum. *Journal of clinical microbiology*, *43*(1), 402-405.

Schallig, H. D., & Oskam, L. (2002). Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. *Tropical Medicine & International Health*, *7*(8), 641-651.

Mendonça, M. G., de Brito, M. E. F., Rodrigues, E. H., Bandeira, V., Jardim, M. L., & Abath, F. G. (2004). Persistence of Leishmania parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure?. *The Journal of infectious diseases*, *189*(6), 1018-1023..

Croft, S. L. (2001). Monitoring drug resistance in leishmaniasis. *Tropical medicine & international health*, *6*(11), 899-905.

Mesgarian F, Nourian R Mahmoudi Rad M,Hajaran H, Shahabz F, Mesgarian Z,et al.identification of leishmania species isolated from human cutaneouse leishmaniasis in Gonabad-e-Qabus city using aPCR method during 2006-2007.Tehran Univ Med J2010 68(4):250-256(Persian).

Yaghoobi-Ershadi, M. R., & Javadian, E. (1997). Studies on sandflies in a hyperendemic area of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. *The Indian journal of medical research*, *105*, 61-66.

Yaghoobi-Ershadi, M. R., Akhavan, A. A., Zahraei-Ramazani, A. R., Javadian, E., & Motavalli-Emami, M. (2000). Field trial for the control of zoonotic cutaneous leishmaniosis in Badrood, Iran. *Annals of Saudi medicine*, *20*(5-6), 386-389.

www.SID.ir

Arch

Fakhr M,Mikkaeili F,Hatam GR Habibi P, Karamian M ,Motazedian MH et al .Molecular epidemiology survey of cutaneous leishmaniasis in referral patient parasitology lab at shiraz school or medicine and importance application of PCR for diagnosis of disease .J Jahrom Univ Med sci 2010 ;8(1):1-5(Persian).

Luis, L., Ramírez, A., Aguilar, C. M., Eresh, S., Barker, D. C., & Mendoza-León, A. (1998). The genomic fingerprinting of the coding region of the β-tubulin gene in Leishmania identification. *Acta tropica*, *69*(3), 193-204.

Valizadh M Dalima A Jafary M, Khamesi –pour A , Mohajer M Determination of leishmania species causing cutaneouse leishmaniasis in masshad by ELIZA using specific monoclonal antibodies Modares J M Med Sci 2004;7(2):107-13.[PERSIAN]

Aransay, A. M., Scoulica, E., & Tselentis, Y. (2000). Detection and identification of Leishmania DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. *Applied and environmental microbiology*, *66*(5), 1933-1938.

Tashakori M Ajdari S Karimian A Mahboudi F Alimohammadian MH Characterization of leishmania species and l.major strains in different endemic areas of cutaneouse leishmaniasis in iran. Irn Biomed j 2003;7(2):43-5

Berzunza-Cruz, M., Cabrera, N., Crippa-Rossi, M., Cabrera, T. S., Pérez-Montfort, R., & Becker, I. (2002). Polymorphism analysis of the internal transcribed spacer and small subunit of ribosomal RNA genes of Leishmania mexicana. *Parasitology research*, *88*(10), 918-925.

Belli, A., Rodriguez, B., Aviles, H., & Harris, E. (1998). Simplified polymerase chain reaction detection of new world Leishmania in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, *58*(1), 102-109.

Hajjaran H, Mousavi P, Burchmore R, Mohebali M, Mohammadi Bazargani M, Salekdeh GH, Kazemi-Rad E, Khoramizadeh MR. Iran J Parasitol. 2015 Jul-Sep;10(3):366-80

Rotureau, B., Ravel, C., Couppié, P., Pratlong, F., Nacher, M., Dedet, J. P., & Carme, B. (2006). Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis to identify the main new world Leishmania species and analyze their taxonomic properties and polymorphism by application of the assay to clinical samples. Journal of clinical microbiology, 44(2), 459-467.

Motalleb, G., Mirahmadi, H., Ahmad, Z. Z., & Mehravaran, A. (2017). Cytochrome b and molecular typing of Leishmania spp. in a passive sampling of suspected patients with cutaneous Leishmaniasis in Sistan and Baluchestan Province, Eastern Iran. *Iranian journal of parasitology*, *12*(4), 534.

Schönian, G., Nasereddin, A., Dinse, N., Schweynoch, C., Schallig, H. D., Presber, W., & Jaffe, C. L. (2003). PCR diagnosis and characterization of Leishmania in local and imported clinical samples. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, *47*(1), 349-358.

Bailey, M.S,and D.N. lock wood .2007 cutaneous. Clin. Dermatol 25:203-110.

Motazedian, H., Karamian, M., Noyes, H. A., & Ardehali, S. D. N. A. (2002). DNA extraction and amplification of Leishmania from archived, Giemsa-stained slides, for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis by PCR. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, *96*(1), 31-34.

www.SID.ir

Arch

Al-Jawabreh, A., Schoenian, G., Hamarsheh, O., & Presber, W. (2006). Clinical diagnosis of cutaneous leishmaniasis: a comparison study between standardized graded direct microscopy and ITS1-PCR of Giemsa-stained smears. *Acta Tropica*, *99*(1), 55-61.

Pourmohammadi, B., Motazedian, M. H., Hatam, G. R., Kalantari, M., Habibi, P., & Sarkari, B. (2010). Comparison of three methods for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Iranian journal of parasitology*, *5*(4), 1.

Karamian, M., Motazedian, M. H., Fakhar, M., Pakshir, K., Jowkar, F., & Rezanezhad, H. (2008). Atypical presentation of Old-World cutaneous leishmaniasis, diagnosis and species identification by PCR. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, *22*(8), 958-962.

Mansueto P Vitale G Di Lorenzo G,Rini GB Mansueto S, Cillari E. Immunopathol Pharmacol .2007,20(3):435-45

Joshi, M. B., & Dwyer, D. M. (2007). Molecular and functional analyses of a novel class I secretory nuclease from the human pathogen, Leishmania donovani. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(13), 10079-10095.

Garcia de Marcos .JA Dean ferrer A ,Alamillos Grandos F ruize Masera JJ ,Cortes Rodriguze B Vidal Jimenes A Garcia lainez A ,Lanzo Rodriguze Mancheno A (2007). Localized leishmaniasis of the oral Mucosa A report of three case. Med, oral cic Bucal. 12(4): 281-6

Asgari, Q., Motazedian, M. H., Mehrabani, D., Oryan, A., Hatam, G. R., Owji, S. M., & Paykari, H. (2007). Zoonotic cutaneous leishmaniasis in Shiraz, Southern Iran: A molecular, isoenzyme and morphologic approach. *J Res Med Sci*, *12*(1), 7-15.

Mohammadi, N., Kazemi, B., Roozkhosh, G., Masoomi, K., & Farghadani, M. T. (2015). A simple, inexpensive and safe method for DNA extraction of frigid and clotted blood samples. *Novelty in Biomedicine*, *3*(3), 119-123.

Saldarriaga, O. A., Castellanos-Gonzalez, A., Porrozzi, R., Baldeviano, G. C., Lescano, A. G., de Los Santos, M. B., ... & Travi, B. L. (2016). An innovative field-applicable molecular test to diagnose cutaneous Leishmania Viannia spp. infections. *PLoS neglected tropical diseases*, *10*(4), e0004638.

Noyes, H. A., Reyburn, H., Bailey, J. W., & Smith, D. (1998). A nested-PCR-based schizodeme method for identifying Leishmania kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of Leishmania tropica in Pakistan. *Journal of clinical microbiology*, *36*(10), 2877-2881.

www.SID.ir