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

**احمد زارع زاده[۱]، غلامرضا مطلب[۲*]، هادی میر احمدی[۳،۴] و علیرضا سلیمی خراشاد[۳،۴]**

[۱] ایران، زابل، دانشگاه زابل، پردیس خودگردان، گروه زیست شناسی

[۲] ایران، زابل، دانشگاه زابل، گروه زیست شناسی

[۳] ایران، زاهدان، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری

[۴] ایران، زاهدان، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۳/۰۴ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۴/۱۰

## چکیده

لیشمانیوز یک بیماری انگلی ناشی ازگونه های لیشمانیا می باشد. 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 گونه های لیشمانیا با استفاده از روشهای مولکولی با هدف قرار دادن ژن ITS-rDNA در بیماران مراجعه کننده 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 جمع آوری گردید. بخشی از نمونه های 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 ازاستخراج DNA با استفاده از تکنیک PCR- RFLP تعیین گونه های لیشمانیا صورت گرفت. نرم افزارهای SPSS و multalin جهت آنالیز نتایج استفاده گردید. تعداد ۴۶ بیمار (۵۶٪) آلوده به لیشمانیا ماژور و۳۶ بیمار(۴۴٪)آلوده به لیشمانیا تروپیکا تشخیص داده شد. گونه غالب در شهرستان چابهار گونه لیشمانیا تروپیکا ودر شهرستان میرجاوه لیشمانیا ماژور بود. در مرکز استان هردو گونه لیشمانیا ماژور وتروپیکا مسؤل بیماری تشخیص داده شد. روش PCR-RFLP دارای حساسیت و اختصاصیت بالا بوده و برای تشخیص لیشمانیوزها و تعیین گونه سریع انگل های عامل بیماری مناسب می باشد.

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

* نویسنده مسئول، تلفن:۰۵۴۳۱۲۳۲۱۸۰ ، پست الکترونیکی: reza.motaleb@uoz.ac.ir

## مقدمه

لیشمانیوز جلدی ( سالک) یک عفونت انگلی پوستی است که توسط گونه های مختلف تک یاخته لیشمانیا ایجاد می شود. این بیماری توسط 'گزش پشه خاکی به انسان انتقال پیدا می کند ودر میزبان انسانی لیشمانیا به صورت انگلهای اجباری درون سلولی، فاگوسیتهای تک هسته ای را آلوده می کند. ابتلا به این بیماری با توجه به نوع گونه انگل و 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 رتیکلو آندوتلیال متغییر می باشد(۴). این بیماری در تمام قاره های جهان به جز استرالیا و اقیانوس منجمد شمالی دیده شده است و در حال حاضر

لیشمانیازیس 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 وبوشهر بیشترین موارد الودگی را داشته اند(۲) . بالغ بر ٪۸۰ موارد سالک کشور نوع روستایی میباشد(۲). بیماری لیشمانیوز جلدی در روستاهای پانزده استان ایران که بدلیل لیشمانیا میجرایجاد شده اند یکی از مشکلات جدی و رو به افزایش می باشد که به شکل بومی دیده می شود (۱۱و۱۴). 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 میباشند (۱۳و۱۵). مشخصات گونه های مختلف جنس لیشمانیا به عوامل متعددی از قبیل توزیع جغرافیایی انگل، تظاهرات بالینی و اپیدمیولوژی بیماری، ناقل و مخزن حیوانی بستگی دارد(۱۰و۸). انگلهای لیشمانیا 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 ملکولی مانند انواع پی سی آر پیشرفته و شناساگرهای ملکولی، شناسایی گونه های متفاوت جنس لیشمانیا میسر گردیده است (۲۲). ژنهایی مانند دی ان ای ریبوزومی (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 کینتوپلاستی (۱۲و۱۶) برای شناسایی انگل لیشمانیا توسط محققین و پژوهشگران استفاده شده اند. حد فاصل 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 Transcribted ETS1 (Spaser 1) و در انتهای ' ۳ ETS2 (External Transcribted Spaser2) قرار دارد. همراه این قطعات در نواحی مختلف، ژن های 18S rDNA, 5.8S rDNA ناحیه Internal Transcribed Spacers1(ITS1) ، ژن 5. 8S rDNA ناحیه Internal Transcribed Spacer 5) ITS2) 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 مفید ند(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 لیشمانیا 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 بروزنسبتا 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 وبلوچستان جمع آوری، هم به روش میکروسکوپی و هم مولکولی عامل بیماری، مورد مطالعه قرار گرفت تا هویت انواع انگل لیشمانیا، در این منطقه بطور قطعی تعیین و تأیید گردد.

## مواد و روشها

بیماران مراجعه کننده به مراکز بهداشتی ودرمانی استان سیستان و بلوچستان (ایرانشهر، چابهار، خاش، زابل، زاهدان، میرجاوه و نیکشهر) پس ازمعاینه 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) ازنقاط 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 برروی 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 ومطابق با جدول شماره ۱ درجه بندی گردید.

جدول۱- درجه تشخیص میکروسکوپی بیماران مشکوک به لیشمانیوزجلدی مورد مطالعه (۱) (۶۰۵ نمونه لام)

| تعداد انگل | تعدادفیلد میکروسکوپ | درجه مشاهده میکروسکوپی |
|---|---|---|
| ۰ | ۱۰۰۰ | ۰ |
| ۱-۱۰ | ۱۰۰۰ | +۱ |
| ۱-۱۰ | ۱۰۰ | +۲ |
| ۱-۱۰ | ۱۰ | +۳ |
| ۱-۱۰ | در هر فیلد | +۴ |
| ۱۰-۱۰۰ | در هر فیلد | +۵ |
| ۱۰۰-۱۰۰۰ | در هر فیلد | +۶ |

جهت تخلیصDNA از کیت استخراج DNA شرکت تکاپو زیست استفاده گردید که به روش ستونی استخراج صورت می گیرد برای جلو گیری از الودگی محتویات کیت به نمونه های مورد استخراج و یا DNA از سر سمپلر های فیلتر دار استفاده ودر هربار کشیدن محلولها سر سمپلر تعوض گردید. استخراج مطابق پروتکل کیت شرکت تکاپو زیست صورت گرفت. DNAی 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 درصـــدو۱۰میکرو لیتردر ژل نمونـــه گذاری و الکتروفورز و در زیر نور ماوراء بنفش با استفاده از دستگاه UV-transiluminator مشاهده گردید.

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

جدول ۲- مواد و مقدار مورد نیاز جهت ساخت cDNA

| نام ماده | مقدار مورد استفاده |
|---|---|
| DNAالگو | ۳ میکرو لیتر |
| آب مقطر دوبار تقطیر بدون نوکلئار | ۳,۵ میکرولیتر |
| Master Mix (Bioneer, Korea) | ۷,۵ میکرولیتر |
| پرایمرIR (تکاپو زیست ) | ۱ میکرولیتر |

برای انتخاب بهترین دمای آنلینگ، PCR با ۴دمای ۵۶، ۵۸، ۶۰، ۶۲سانتیگراد انجام شد که بهترین باندها دردمای ۵۸درجه ساتیگراد 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 وپر انگل بودند صورت گرفته بود)، به همین منظوراز روش Nested PCR (PCR2) استفاده گردید.

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 آنز یم DNA پلی مراز | ۶۰ ثانیه | ۷۲ |
| برای اطمینان از ساخت کامل قطعات | ۵ دقیقه | ۷۲ |
| مرحله ۲ تا ۴ (۳۵ سیکل تکرار) | --- | --- |
| دمای ۴درجه ساتیگراد | --- | --- |

جهت Nested PCR، از محصول PCR1، ۲میکرولیتر برداشته و به میکروتیوب ۰,۲ منتقل و به آن ۴۸ میکرولیترآب مقطر استریل اضافه وازآن بعنوان DNA الگو درNested PCR (PCR2) استفاده نمودیم. حجم کل واکنش PCR دراین مرحله ۲۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد (۳ میکرولیترDNA، ۶ میکرولیترآب مقطر دوبار تقطیر بدون نوکلئار(DDW)، ۱۰میکرولیترMasterMix و۱میکرولیتر پرایمر ITS). توالی پرایمرها در جدول ۴ ارایه شده که از شرکت تکاپو زیست تهیه گردید.

جدول۴- 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' |

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 و۳ میکرولیتر از محصول Nested PCR را به صورت جداگانه (۱میکرولیتر لدر درچاهک اول و۵ میکرولیترمحصول PCR1 و ۵ میکرولیتر از محصول (PCR2) به ژل ۲درصد اضافه گردید وجریان الکتروفورز با ولتاژ۹۰ به مدت ۴۰ دقیقه برقرار واز محصول عکس برداری به عمل آمد.

**RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism)**

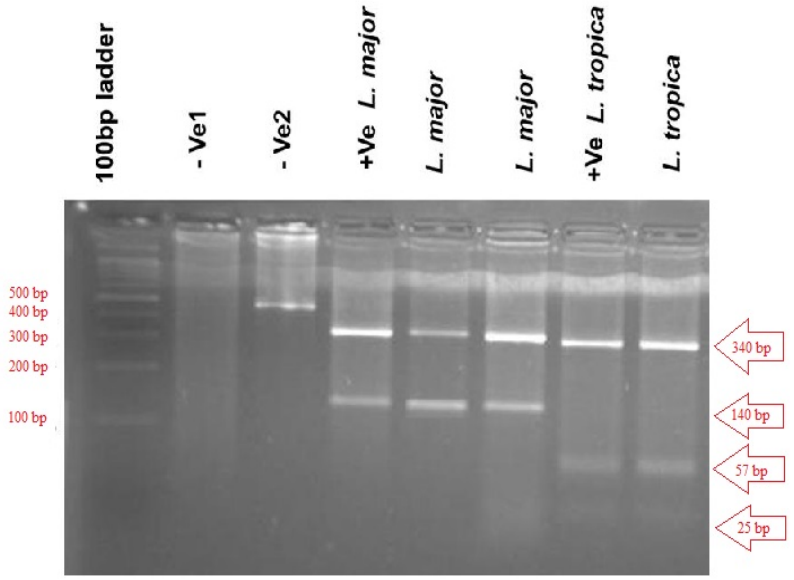
با تکثیر ناحیه ITS باند حاصل 480bp برای تمام گونه های انگل یکسان می باشد و افتراق گونه های انگل غیر ممکن می باشد به همین دلیل برای تعیین گونه انگل به محصول PCRآنزیم محدود کننده معرفی شده توسط Dweik را اضافه نمودیم، این آنزیم توالیITS1 را در قسمت GG↓CC برش می دهد می کندودر انگل لیشمانیا با توجه به تعداد نقاط برش محل های مختلفی قطع خواهند شد به همین منظور آنزیم*BSUR1* مناسب تشخیص داده شد که پس از الکتروفورز، محصول به صورت باندهای جداگانه برروی ژل قابل رویت بود ومی توانستیم گونه های انگل را

از روی این قطعات وطول باندها از یکدیگر متمایز نماییم و با مشاهده پلی مورفیسم ایجادشده دراثر هضم آنزیمی که برای هرگونه اختصاصی است توانستیم به نوع انگل پی ببریم. ۱۵میکرولیترحجم نهایی واکنش در این مرحله می‌باشدکه مواد زیر باهم در میکرو تیوب ۰,۲ به شرح ذیل ترکیب شدند: ۱۰میکرولیترمحصولPCR2، 1 میکرولیتر بافر ۲ مخصوص آنزیم، ۱میکرو لیتر آنزیم محدود کننده و ۷ میکرولیتر آب مقطر ۲بار تقطیربدون نوکلئار به میکرو تیوبهای ۰,۲ منتقل و درب میکرو تیوبها جهت جلوگیری از تبخیرمواد واکنش با پارافیلم مسدود گردید و میکرو تیوبها به مدت ۸ ساعت در ۳۷در جه 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$^{Tm}$4.1.1software (Gene Codes Corporation) 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 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 وتکنیک 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 *B*suR1 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.




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* قرارگرفته است. –Ve1: کنترل منفی (با آنزیم بدون محصول); Ve2:

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

جدول۵- قطعات حاصل از عمکرد آندونکلئازی آنزیم BSUR1 بر روی محصول ژن DNA ITS

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

در این تحقیق از۸۲ نمونه اینکه با هدف قرار دادن ژن ITS به وسیله ی پرایمرهایTSF1 وITS2R 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 ترویپکا | ۳۶ | ۴۳,۹ |
| مجموع | ۸۲ | ۱۰۰ |

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

از تعداد ۸۲ بیمارمبتلا به سالک جلدی تعداد ۴۹ مورد ساکن شهرو تعداد ۳۳ مورد ساکن روستاها بودند که بر اساس آزمون $x^2$ ارتباط معنی داری بین تعداد زخم و گونه عامل بیماری وجود ندارد (جدول ۸).

جدول ۷ - پراکندگی 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 ترویپکا | درصد |
|---|---|---|---|---|
| ایرانشهر | 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 ترویپکا و ماژور را با هاپلوتایپ های ثبت شده در GenBank و لیشمانیا ماژور و ترویپکا جدا شده از مبتلایان در شمال، جنوب و مرکز استان که با نرم افزار آنلاین 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.

```
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  TTCCCACATA CACAGCAAAC TTTTATACTC GAAATTTGCA GTAAAAAAGG
CCGATCGACG TTGTAGAACG
Leishmania major isolate Zahed  TTCCCACATA CACAGCAAAC TTTTATACTC AAAGTTTGCA GTAAAAAAGG
CCGATCGACG TTGTAGAACG
Leishmania major isolate Zahed  TTCCCACATA CACAGCAAAC TTTTATACTC AAAATTTGCA GTAAAAAAGG
CCGATCGACG TTGTAGAACG
Leishmania major isolate Zahed  TTCCCACATA CACAGCAAAC TTTTATACTC AAAATTTGCA GTAAAAAAGG
CCGATCGACG TTGTAGAACG

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

                                                  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  TTCCTATTTC GTTGAAGAAC GCAGTAAAGT GCGATAAGTG GTATCAATTG
CAGAATCATT CAATTACCGA
Leishmania major isolate Zahed  TTCCTATTTC GTTGAAGAAC GCANNAAAGN GCGATAAGTG GTATCAATTG
CAGAATCATT CAATTACCNA
Leishmania major isolate Zahed  TTCCTATTTC GTTGAAGAAC GCAGTAAAGT GCGATAAGTG GTATCAATTG
CAGAATCATT CAATTACCGA
Leishmania major isolate Zahed  TTCCTATTTC 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 سکوئنسینگ

## بحث

نتیجه تحقیق، حاکی از موجود بودن هر دو فرم لیشمانیوز جلدی آنتروپوژنیک و زئونوتیک در استان سیستان و بلوچستان می باشد که از دلایل آن میتوان به ورود اتباع بیگانه غیرمجاز به کشور اشاره نمود. با توجه به این که این بیماری توسط پشه خاکی از فرد مبتلا به سالک منتقل می‌شود حضور این افراد که بدون هیچ گونه کنترل بهداشتی وارد کشور می شوند در انتشار این بیماری مؤثر است به طوری که حدود ۱۹ درصد موارد مبتلا در سال های اخیردر منطقه مورد مطالعه را اتباع بیگانه تشکیل می‌دهند. همچنین در شرح حال این بیماران سابقه سفر به کانوتهای آلوده کرمان ویزد وبندر عباس وجود داد. در تحقیق حاضر، با توجه به همخوانی نتایج DNA sequencing با PCR-RFLP و نیز ایجاد الگوی باندی مربوط به لیشمانیا در مورد تمام نمونه ها، به نظر میرسد که PCR انجام شده، اختصاصی عمل کرده و احتمال پاسخ مثبت کاذب در آن ناچیز است. در مطالعه ی به عمل آمده توسط فولادی و همکاران که در منطقه مرزی میرجاوه به عمل آمده است لیشمانیا ماژور به عنوان عامل ۱۰۰در صد بیماری گزارش گردیده است. نتایج حاصل از این تحقیق وجود لیشمانیا ترو پیکا در این منطقه را نیز اثبات می نماید(۳). درمطالعه ثقفی پوروهمکاران در بخش مرکزی استان قم بااستفاده ازتکنیک PCR-RFLP، نمونه های انسانی ویک نمونه ازجونده گونه مریونس لیبیکوس برای تعیین هویت انگل لیشمانیا موردآزمایش قرارگرفته و مشخص شدکه انگل موجود در لامهای انسانی و جونده، لیشمانیا ماژور بوده است (۲۳). در مطالعه واعظ نیا و همکاران در مشهد، ۳۴درصد نمونه ها لیشمانیا ماژور بود که تقریباً مشابه نمونه های انسانی و حیوانی کانون بومی بیماری لیشمانیوز جلدی در بخش مرکزی قم می باشد. در ضمن ۶۶ درصد نمونه ها لیشمانیا تروپیکا بودند (۲۴). در مطالعه دیگری در خصوص تعیین هویت انگل لیشمانیا با استفاده از تکنیک PCR-RFLP در لام های 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 لام های انسانی وجوندگان، لیشمانیا ماژور (عامل لیشمانیوز جلدی روستایی) می باشد (۲۵). علت ناهمخوانی نتایج مطالعه مدکور با تحقیق حاضر می تواند وسعت منطقه جغرافیای مورد مطالعه و وجود کانونهای 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 می باشد که از دلایل آن میتوان به ورود اتباع بیگانه غیرمجاز به کشور اشاره نمود. با توجه به این که این بیماری توسط پشه خاکی از فرد مبتلا به سالک منتقل می شود، حضور این افراد که بدون هیچ گونه کنترل بهداشتی وارد کشور می شوند، در انتشار این بیماری مؤثر است به طوری که حدود ۱۹ درصد موارد مبتلا در سال های اخیردر منطقه مورد مطالعه را اتباع بیگانه تشکیل می دهند همچنین در شرح حال این بیماران سابقه سفر به کانوتهای آلوده کرمان ویزد وبندر عباس وجود دارد. شناسایی و

تعیین هویت انگل لیشمانیا با استفاده از روش مولکولی PCR-RFLP در لام های رنگ آمیزی شده باگیمسا در نمونه های انسانی، روش مناسب و به صرفه ای است. مزایای این روش این است که بدون انجام تعیین توالی ژن ها، تشخیص گونه های انگل لیشمانیای مولد بیماری امکان پذیر خواهد بود. بنابراین این تکنیک PCR-RFLP در کنار سایر روش ها مثل تزریق انگل به حیوان آزمایشگاهی، کشت انگل و تست های سرولوژی روش مفیدی خواهد بود. ضمن این که تکنیک حساسیت و ویژگی بالا بوده و می‌تواند در طی ۲۴ ساعت علاوه بر تشخیص لیشمانیوز، نوع گونه انگل را تعیین هویت نمود.

## تشکر و قدردانی

بدینوسیله از دانشگاه زابل و دانشگاه علوم پزشکی زاهدان و نیز آقای مهندس حمید ملک رییسی تشکر و قدردانی می شود.

## منابع

۱- بقایی، ا، سیدان جاسبی، ا، آخوندی، م، میرزایی، ه، دهنام، ا.۱۳۹۱. تشخیص میکروسکوپی و تعیین هویت 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 وآموزش پزشکی معاونت بهداشت مرکز مدیریت بیماریهای واگیر.

۳-فولادی ب، شریفی ا، ابراهیم زاده، ع، هاشمی شهری، س، مرادقلی، ح، سرابندی نو، ا، فضایلی، 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. Intragenomic 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- 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. 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. Firstdetection of *Leishmania major* in peridomestic Iranian sandflies: comparison ofnested PCR of nuclear ITS ribosomal DNA and semi-nested PCR of minicirckinetoplast 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-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.

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., Mohebali, 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 PCRRFLP method. Archives of Razi; 64(1):39-44.

25- Mohammadi Azni S, Rasi Y, Oshaghi M A, Yaghoubi Ershadi M, Mohebali 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