

Original Paper

Identification of *Leishmania* using microscopic and molecular methods in suspected patients of Cutaneous Leishmaniasis by targeting ITS-rDNA gene, Golestan province, Iran (2009-10)

Baghaei A (MSc)¹, Parvizi P (PhD)^{*2}, Amirkhani A (PhD)³
Honarvar MR (MD, MPH)⁴, Badieli F (MD, MPH)⁵

¹MSc in Microbiology, Molecular Systematics Laboratory, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran. Department of Microbiology, Islamic Azad University Qom branch, Qom, Iran. ²Associate Professor, Molecular Systematics Laboratory, Department of Parasitology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran. ³Associate Professor, Department of Epidemiology, Islamic Azad University, Medical Sciences of Tehran branch, Tehran, Iran. ⁴PhD Candidate in Nutrition, Health Management and Social Development Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran. ⁵General Physician, Health Management and Social Development Research Center, Gorgan, Iran.

Abstract

Background and Objective: Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis (ZCL) is a parasitic disease which caused by a protozoan belongs to the genus *Leishmania*. ZCL is of great public health importance in many countries and also in endemic parts of Iran. *Leishmania major* is the causative agent, *Phlebotomus papatasi* as the main vector and *Rhombomys opimus* is the most important reservoir of the disease. Species identification of *Leishmania* in a large scale of human samples is necessary to conduct a useful program for controlling the disease outspread. This study was done to identify the *Leishmania* using microscopic and molecular methods in suspected patients of Cutaneous Leishmaniasis by targeting ITS-rDNA gene, Golestan province, Iran.

Materials and Methods: 121 smears collected from suspected patients of ZCL, in Eastern region of Golestan province, Iran during 2009-10, stained and examined under a light microscope. DNA of parasites extracted directly from smears and ITS-rDNA gene amplified. Positive samples digested with BsuRI restriction enzyme, according to RFLP method and subsequently the parasite was identified. After sequencing the ITS-rDNA gene, Molecular software was applied for verification of RFLP results. The achieved results were definitely approved by this procedure.

Results: 113 out of 121 and 92 out of 121 samples detected as *Leishmania* positive using microscopic examination and molecular method respectively. All 92 molecular positive samples digested with BsuRI endonuclease and 90 individuals identified as *Leishmania major*. In order to final verification, 8 samples of *Leishmania major* sequenced and confirmed by molecular software analysis. Unfortunately, sequences of two samples which were not *Leishmania major* were not readable, and consequently, these could not be identified.

Conclusion: Comparison of obtained sequences of current study with Gene Bank sequences confirmed *L. major* in human from Northern Iran. Other species of *Leishmania* were not identified in this investigation but detection of two other samples, which were not *L. major*, could indicate the role of other *Leishmania* species causing infection in human in Eastern region of Golestan province, northern Iran. These findings should be considered to improve the disease control programs, which can be led to increase the rate of public health in Golestan province.

Keywords: *Leishmania major*, ITS-rDNA, clinical samples, Golestan, Iran

*** Corresponding Author:** Parvizi P (PhD), E-mail: parp@pasteur.ac.ir

Received 19 Jun 2011

Revised 23 Aug 2011

Accepted 5 Sep 2011

This paper should be cited as: Baghaei A, Parvizi P, Amirkhani A, Honarvar MR, Badieli F. [Identification of *Leishmania* using microscopic and molecular methods in suspected patients of Cutaneous Leishmaniasis by targeting ITS-rDNA gene, Golestan province, Iran (2009-10)]. J Gorgan Uni Med Sci. 2012; 14(3): 72-81. [Article in Persian]

تحقیقی

تعیین هویت انگل لیثمانیا با استفاده از روش‌های میکروسکوپی و مولکولی

و با هدف قرار دادن ژن ITS-rDNA در افراد مشکوک به لیثمانیوز در استان گلستان (۸۹-۱۳۸۸)

احمد بقائی^۱، دکتر پرویز پرویزی^{۲*}، دکتر عارف امیرخانی^۳، دکتر محمدرضا هتور^۴، دکتر فرهاد بدیعی^۵

۱- کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، آزمایشگاه سیستماتیک ملکولی، انستیتو پاستور ایران، گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم. ۲- دانشیار گروه انگل‌شناسی، آزمایشگاه سیستماتیک ملکولی، انستیتو پاستور ایران. ۳- دانشیار گروه اپیدمیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی تهران. ۴- پزشک عمومی، دانشجوی دکتری تغذیه، عضو مرکز تحقیقات مدیریت سلامت و توسعه اجتماعی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان. ۵- پزشک عمومی، عضو مرکز تحقیقات مدیریت سلامت و توسعه اجتماعی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان.

چکیده

زمینه و هدف: لیثمانیوز جلدی روستایی یک بیماری انگلی تک‌یاخته‌ای مشترک بین انسان و حیوان است که به عنوان یک معضل بهداشتی در بسیاری از کشورها و نیز ایران مطرح است. عامل بیماری لیثمانیا میجر، ناقل اصلی آن فلیوتوموس پاپاتاسی و مهم‌ترین مخزن، رومبومیس ایپوموس می‌باشد. انسان مخزن اتفاقی لیثمانیوز جلدی روستایی است. این مطالعه به منظور تعیین هویت انگل لیثمانیا با تشخیص میکروسکوپی و مولکولی و هدف قرار دادن ژن ITS-rDNA در شرق استان گلستان انجام شد.

روش بررسی: این مطالعه توصیفی مقطعی روی ۱۲۱ فرد مشکوک به بیماری لیثمانیوز جلدی روستایی در شهرستان‌های گنبد و مراوه‌تپه در شرق استان گلستان در سال‌های ۸۹-۱۳۸۸ انجام شد. از ضایعات نمونه‌برداری مستقیم صورت گرفت و پس از رنگ‌آمیزی با گیمسا مشاهده میکروسکوپی به عمل آمد. از گسترش‌ها DNA استخراج و ژن ITS-rDNA با استفاده از PCR تکثیر یافت. موارد مثبت لیثمانیا با استفاده از آنزیم BsuRI به روش RFLP تعیین گونه شد و با تعیین توالی و استفاده از نرم‌افزارهای مولکولی گونه لیثمانیا تایید شد.

یافته‌ها: از کل ۱۲۱ فرد مشکوک به بیماری لیثمانیوز جلدی روستایی، ۱۱۳ نفر با مشاهدات میکروسکوپی و ۹۲ نفر با روش مولکولی به انگل لیثمانیا آلوده تشخیص داده شدند. موارد مثبت PCR با استفاده از روش RFLP تعیین گونه و ۹۰ مورد لیثمانیا میجر تشخیص داده شد. برای تأیید نهایی ۸ مورد لیثمانیا میجر تعیین توالی گردید و مجدداً مورد تأیید قرار گرفت. در ۲ مورد از موارد مثبت که توالی نامشخص بود؛ گونه لیثمانیا مشخص نشد.

نتیجه‌گیری: با مقایسه نتایج تعیین توالی انگل لیثمانیا در این مطالعه با موارد ثبت شده در بانک جهانی ژن، لیثمانیا میجر به‌طور قطع در انسان در منطقه مورد تأیید قرار گرفت. با توجه به گزارش‌های مربوط به دیگر گونه‌های لیثمانیا در ناقلین و مخازن، این گونه‌ها در این مطالعه در انسان یافت نگردید. هرچند دو مورد غیر لیثمانیا میجر می‌تواند نشانی از آلودگی همزمان بیش از یک گونه لیثمانیا در انسان در منطقه باشد؛ اما با روش‌های به‌کار رفته در این مطالعه آلودگی همزمان دو لیثمانیا در یک فرد قابل تفکیک نبود.

کلید واژه‌ها: لیثمانیا میجر، ITS-rDNA، لیثمانیوز جلدی روستایی، گلستان

* نویسنده مسؤول: دکتر پرویز پرویزی، پست الکترونیکی parp@pasteur.ac.ir

نشانی: تهران، خیابان پاستور، انستیتو پاستور ایران، کدپستی ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱، آزمایشگاه سیستماتیک مولکولی، تلفن و نمابر ۶۶۴۹۶۴۱۴-۰۲۱
وصول مقاله: ۹۰/۳/۲۹، اصلاح نهایی: ۹۰/۶/۱، پذیرش مقاله: ۹۰/۶/۱۴

مقدمه

توجه سازمان بهداشت جهانی بوده است. به‌طوری‌که این بیماری از ده بیماری مهم مناطق گرمسیری محسوب می‌شود و بخش تحقیقات بیماری‌های گرمسیری سازمان بهداشت جهانی (TDR) این بیماری را در ردیف سه بیماری اول (تریپانوسوم آفریقایی، دانگ و لیثمانیوزها) و جزو بیماری‌های نوپدید و غیرقابل کنترل قرار داده است (۳و۴).

در حال حاضر بیماری لیثمانیوز در ۸۸ کشور جهان در قاره‌های آسیا، اروپا، آفریقا و آمریکا دیده می‌شود و در میان این کشورها ۷۲ کشور در حال توسعه و ۱۳ کشور کمتر توسعه یافته وجود دارد. در

انواع بیماری لیثمانیوز به‌عنوان یکی از مشکلات عمده بهداشتی و پزشکی در بسیاری از کشورهای جهان از جمله ایران مطرح است و عوامل بیماری گونه‌های انگل لیثمانیا، ناقلین بیماری، انواع پشه خاکی‌ها و مخازن بیماری سگ‌سانان و چونندگان می‌باشند. سه گونه از انگل لیثمانیا به‌عنوان عامل بیماری لیثمانیوز انسانی در ایران شناخته شده‌اند که از نظر اهمیت اپیدمیولوژیکی به ترتیب شامل لیثمانیا میجر، لیثمانیا تروپیکا و لیثمانیا اینفانتوم می‌باشند (۱و۲). به‌علت اهمیتی که این بیماری از نظر بهداشتی دارد؛ سال‌ها مورد

تعیین توالی بخشی از ژنوم انگل لیثمانیا همواره با شک و تردید مواجه بوده است. در ایران گونه‌های انگل لیثمانیا به عنوان عامل بیماری لیثمانیوز جلدی با توجه به علائم بالینی، تمرکز جغرافیایی، مخازن حیوانی اختصاصی، آلودگی‌های آزمایشگاهی به مخازن حیوانی یا ناقل، سرولوژی و گاهی با مونوکلونال آنتی‌بادی در بیماران، کاراکتریزه شده است. تشخیص آلودگی‌های لیثمانیایی با به کارگیری روش‌های بیوشیمیایی یا مولکولی محدود بوده است. از سوی دیگر استفاده از روش‌های مولکولی نیز بعضاً در حد انجام PCR و مشاهده باند مربوطه در ژل محدود شده است و بهره‌گیری از روش‌های پیشرفته همچون تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن مورد مطالعه و آنالیزهای مولکولی و فیلوژنتیک در تعیین هویت انگل لیثمانیا، به ندرت به کار گرفته شده است و در صورت انجام نیز از تعداد معدودی نمونه استفاده شده است (۱۵ و ۱۶). لذا این مطالعه به منظور تعیین هویت انگل لیثمانیا با تشخیص میکروسکوپی و مولکولی و هدف قرار دادن ژن ITS-rDNA در شرق استان گلستان انجام شد.

روش بررسی

جمع‌آوری نمونه‌ها

این مطالعه توصیفی مقطعی روی ۱۲۱ فرد مشکوک به بیماری لیثمانیوز جلدی روستایی در شرق استان گلستان طی سال‌های ۸۹-۱۳۸۸ انجام شد.

ابتدا اطلاعات مربوط به افراد مشکوک به بیماری از مراکز بهداشت و درمان شهرستان‌های گنبد و مراوه‌تپه در شرق استان گلستان دریافت شد. از ضایعات پوستی و زخم‌های مشکوک به سالک، با مراجعه حضوری به روستاها نمونه‌برداری صورت گرفت. ابتدا سطح زخم با الکل ۹۶ درصد ضدعفونی شد. چنانچه زخم پوشیده از عفونت باکتریایی یا قارچی بود؛ قسمت موردنظر برای نمونه‌برداری از ضایعات عفونی پاک شد. به کمک لنت یکبار مصرف استریل، از لبه و حاشیه زخم در جهت مرکز به حاشیه شکافی در زیر ناحیه متورم ایجاد گردید. سپس مقداری از سروزیت توسط لنت به سطح لام منتقل شد و به خوبی پخش گردید (۱۷). نمونه‌برداری به صورتی انجام شد که حتی المقدور در نمونه‌ها خون وارد نگردد. برای هر فرد اطلاعاتی شامل سن، شغل، محل سکونت، میزان تحصیلات، نوع زخم، مدت ابتلا به زخم، تعداد ضایعات، محل ضایعه، سابقه مسافرت به مناطق اندمیک و سابقه مصرف دارو در پرسشنامه‌ای ثبت شد.

مشاهده و درجه‌بندی لام‌های رنگ آمیزی شده

اسمیرهای تهیه شده در شرایط آزمایشگاه قرار گرفته و خشک شدند. نمونه‌ها با متانول ۹۵ درصد به مدت ۳۰ ثانیه فیکس شدند. سپس با رنگ گیمسا (رقت ۱:۱۰ با آب مقطر) و به مدت ۲۰ تا ۳۰

تعدادی از کشورهای توسعه یافته در اروپا نیز لیثمانیوز کم و بیش شیوع دارد. این بیماری در استرالیا و قطب جنوب گزارش نشده است (۶ و ۵).

میزان شیوع این بیماری در جهان ۱۴-۱۲ میلیون مورد و میزان بروز سالیانه آن ۲-۱/۵ میلیون مورد است که ۵۰۰ هزار مورد آن مربوط به لیثمانیوز احشایی و بقیه مربوط به لیثمانیوز جلدی و جلدی-مخاطی می‌باشد. حدود ۳۵۰ میلیون نفر در جهان در معرض خطر این بیماری قرار دارند (۷ و ۸).

حدود ۹۰ درصد موارد لیثمانیوز جلدی از ۸ کشور جهان شامل افغانستان، برزیل، ایران، پرو، عربستان سعودی، سوریه، الجزایر و سودان و ۹۰ درصد موارد لیثمانیوز جلدی -مخاطی از ۳ کشور جهان شامل بولیوی، برزیل و پرو و ۹۰ درصد موارد لیثمانیوز احشایی از ۵ کشور جهان از جمله بنگلادش، هندوستان، سودان، نپال و برزیل گزارش می‌شود. براساس گزارش‌های رسمی، میزان مرگ و میر ناشی از لیثمانیوز احشایی سالیانه ۵۹۰۰۰ نفر می‌باشد (۹).

مطالعات بسیاری در مورد همه گیرشناسی، ناقلین، مخازن و تعیین هویت انگل لیثمانیا و عوامل لیثمانیوز در نقاط مختلف کشور انجام شده است (۱ و ۲ و ۹). در اغلب مطالعات از روش‌های متداول مورفولوژیکی و میکروسکوپی استفاده شده است. مطالعه بر روی آلودگی لیثمانیایی در ایران از سال ۱۹۵۳ در شمال شرقی ایران در منطقه ترکمن صحرا (شرق استان گلستان) و لطف آباد (از بخش‌های شهرستان درگز استان خراسان رضوی) شروع شد (۱۰ و ۱۱). به تدریج این مطالعات به مناطق دیگر ایران گسترش پیدا کرد. این مطالعات فقط بر روی آلودگی‌های لپتومونادی مطالعه شده است و انگل دقیقاً جدا و تایپ نشده بود. در اکثر مطالعات محققین در ایران رومبومیس اپیموس به عنوان مخزن اصلی بیماری و فلبوتوموس پاپاتاسی به عنوان ناقل اصلی لیثمانیوز جلدی نوع روستایی در ایران گزارش شده است (۱۲-۱۰). هرچند در مطالعات محققان ایرانی در بعضی از مناطق ایران مریونس لیپیکوس به عنوان مخزن ثانویه و بعضی از گونه‌های پشه خاکی زیرجنس پارافلبوتوموس به عنوان ناقلین ثانویه معرفی شده‌اند و گونه‌های پشه‌خاکی زیرجنس پارافلبوتوموس نقش حفظ سیکل انگل را در مخازن حیوانی بیماری ایفا می‌کنند (۱ و ۱۳).

تعیین هویت انگل لیثمانیا در انسان، مخزن و ناقل بیماری لیثمانیوز با روش‌های متداول آزمایشگاهی، ایزوآنزیم، مونوکلونال آنتی‌بادی و تکثیر بخشی از ژنوم انگل لیثمانیا به روش PCR در ایران متداول است (۱۴). هرچند تعیین هویت انگل برای شناخت وضعیت بیماری با روش‌های فوق تا حدودی مورد تأیید بعضی از متخصصین می‌باشد؛ اما تعیین و تأیید قطعی انگل بدون سکانس و

دقیقه رنگ آمیزی شدند. پس از رنگ آمیزی، لام‌ها با آب شسته شدند و پس از خشک شدن، آماسیگوت‌های انگل بر روی لام در زیر میکروسکوپ نوری با روغن ایمرسیون و درشت‌نمایی $100\times$ جستجو شدند. موارد مثبت در مشاهدات میکروسکوپی، براساس متوسط تعداد انگل در هر میدان دید میکروسکوپی از گسترش تهیه شده، از یک مثبت تا شش مثبت درجه‌بندی گردیدند (۱۸).

استخراج DNA

برای استخراج DNA از گسترش‌های تهیه شده بر روی لام و رنگ آمیزی شده با گیمسا، ابتدا گسترش‌هایی که دارای لامل بودند؛ در داخل گریل به مدت یک شبانه روز قرار گرفتند تا لامل یا پوشش لام‌ها جابه‌جا شده و به راحتی بدون از بین رفتن گسترش، برداشته شود. سپس لام‌ها توسط اتانول ۹۶ درصد شسته شدند. بعد از خشک شدن لام‌ها، مقدار $300\ \mu\text{l}$ بافر لیزکننده (50mM NaCl ، 50mM Tris ، 10mM EDTA ، 1% Triton v/v با pH ۴) روی گسترش ریخته شد و بعد از چند دقیقه در حرارت اتاق، گسترش به‌طور کامل از روی لام کنده شد و با استفاده از سمپلر محتویات روی لام به میکروتیوب‌های $1/5$ میلی‌لیتری انتقال یافت. سپس بلافاصله کد اختصاصی نمونه روی میکروتیوب ثبت گردید. مقدار $15\ \mu\text{l}$ پروتئیناز K (فرمتاز) با غلظت 20 mg/ml به محلول فوق افزوده شد و به آرامی مخلوط گردید و به مدت ۴-۶ ساعت در بن‌ماری ۵۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. برای جلوگیری از ورود آب به میکروتیوب‌ها یا تبخیر بافر درب آنها با پارافیلیم به خوبی محکم شد. بعد از خارج نمودن نمونه‌ها از بن‌ماری به هر میکروتیوب، مقدار $300\ \mu\text{l}$ فنل اشباع اضافه و به مدت ۵ دقیقه به آرامی با آن مخلوط گردید. سپس نمونه‌ها با دور 10000 rpm و به مدت ۱۲ دقیقه در ۱۰ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. بعد از سانتریفوژ سه فاز در میکروتیوب تشکیل گردید. فاز بالایی (supernatant) یا فاز آبی که شفاف‌تر و حاوی DNA بود؛ توسط سمپلر با دقت به یک میکروتیوب جدید $1/5$ میلی‌لیتر منتقل شد. مقدار هم حجم مخلوط از محلول فنل-کلروفرم به میکروتیوب‌ها اضافه و به مدت ۵ دقیقه به آرامی با آن مخلوط گردید و مجدداً سانتریفوژ شد. پس از جداسازی فاز رویی (supernatant) و انتقال آن به میکروتیوب جدید، مقدار $300\ \mu\text{l}$ کلروفرم خالص افزودیم و به آرامی تکان داده و مجدداً سانتریفوژ نمودیم. در این مرحله بقایای فنل که ماده‌ای بازدارنده بود؛ به فاز زیرین رفت و حذف شد. پس از انتقال فاز رویی به میکروتیوب جدید به میزان $0/1$ حجم محلول، استات سدیم ۳ مولار افزوده شد. سپس معادل دو برابر حجمش اتانول سرد ۹۶ درصد نیز به آن اضافه گردید. میکروتیوب حاوی محلول‌های فوق را به آرامی در دست حرکت دادیم و رشته‌های DNA در این مرحله به دلیل وجود الکل خالص و آبگیری

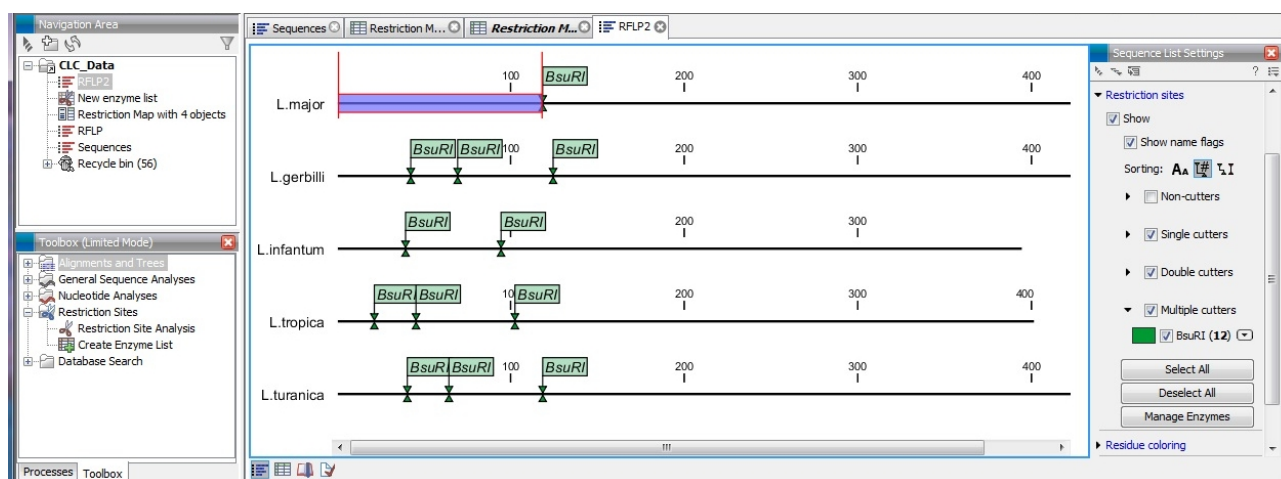
کم کم ظاهر شد. میکروتیوب‌ها، به مدت یک شب در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس نمونه‌ها به مدت ده دقیقه با دور 12000 rpm در میکرونیوژ یخچال‌دار سانتریفوژ شدند. اتانول موجود در میکروتیوب‌ها، به آرامی دور ریخته شدند و مابقی آن نیز با سمپلر تخلیه شد. مقدار $200\ \mu\text{l}$ اتانول ۷۰ درصد به رسوب افزوده شد و مطابق شرایط مرحله قبل سانتریفوژ شدند. با خم کردن میکروتیوب‌ها، اتانول موجود به آرامی دور ریخته شد و مابقی با سمپلر به دقت برداشته شد. سپس در میکروتیوب‌ها باز و به حالت ایستاده در اتو ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا بقایای الکل موجود در آنها کاملاً تبخیر شود. در آخرین مرحله DNA حاصل، در $35\ \mu\text{l}$ آب مقطر دوبار تقطیر استریل یا $1\times\text{ TE}$ حل شد و مدت ۱۵ دقیقه در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس به یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد منتقل شد (۱۹).

PCR با هدف قرار دادن ژن ITS-rDNA

از ژن ITS-rDNA برای تعیین آلودگی لیشمانیایی در افراد مشکوک به بیماری استفاده شد. این ژن از ژن‌های هسته‌ای است که در بین زیرواحدهای ریبوزومی واقع است. برای تکثیر ژن از دستگاه PCR استفاده شد. برای انجام PCR از دو پرایمر (forward) ITS1F ($5'\text{GCAGCTGGATCATTTTCC3}'$) و (reverse) ITS2R4 ($3'\text{ATATGCAGAAGAGAGGAGGC5}'$) استفاده شد و یک قطعه که حدود ۴۳۰ جفت باز (بدون احتساب پرایمرها) می‌باشد؛ تکثیر یافت (۲۰).

هضم محصولات PCR به روش RFLP و سکانس توالی‌ها

تمام موارد مثبت محصولات PCR توسط آنزیم اندونوکلئاز BsuRI و با روش RFLP مورد هضم قرار گرفت. آنزیم‌های اندونوکلئازی که به آنها آنزیم‌های محدودکننده (Restriction Enzyme) نیز می‌گویند؛ قادرند رشته DNA را در نواحی با توالی خاص بشکنند و لذا قطعات DNA بسته به نوع آنزیم به کار رفته و توالی DNA به قطعات مختلف با اندازه‌های متفاوت خرد می‌شوند (جدول یک). انتخاب آنزیم BsuRI با آنالیز سکانس گونه‌های رفرنس لیشمانیا توسط نرم‌افزار CLC DNA Workbench 5.2 صورت گرفت (شکل یک). پس از الکتروفورز این قطعات مشاهده و با یکدیگر مقایسه شد. هر گونه از لیشمانیا دارای قطعه یا قطعات اختصاصی می‌باشد (۲۱). از آنزیم BsuRI (HaeIII) که DNA را در ناحیه GG↓CC شناسایی کرده و می‌شکند؛ استفاده شد. محصول ITS1-PCR هر کدام از سویه‌های رفرنس و نمونه‌ها مورد هضم توسط این آنزیم قرار گرفت. تعدادی از محصولات PCR که با روش RFLP تعیین گونه شده بودند و تعدادی نیز که با این روش مشکوک بوده و قابل تشخیص قطعی



شکل ۱: نمایشی از نرم افزار CLC DNA Workbench 5.2
سکانس ITS-rDNA مربوط به گونه های مختلف انگل لیشمانیا و جایگاه های برش توسط آنزیم BsuRI

جدول ۱: تفاوت جایگاه برش و قطعات حاصل از عملکرد اندونوکلازی آنزیم BsuRI
بر روی محصول PCR گونه های مختلف لیشمانیا

گونه لیشمانیا	جایگاه برش آنزیم از سمت ۵'	تعداد قطعات حاصل	اندازه قطعات (bp)
لیشمانیا میجر	۱۲۰	۲	۱۲۰ و ۳۱۰
لیشمانیا تروپیکا، تورانیکا	۱۲۰، ۷۰، ۴۰	۴	۳۱۰، ۴۰، ۵۰ و ۳۱۰
لیشمانیا اینفانتوم	۱۲۰، ۷۰	۳	۳۱۰، ۷۰، ۵۰

از مجموع ۱۲۱ نمونه، ۹۲ مورد با آزمایش PCR مثبت تشخیص داده شد. نمونه های مربوط به ۸ نفر از افراد مشکوک به لیشمانیوز جلدی که در مطالعات میکروسکوپی منفی تشخیص داده شدند؛ مجدداً با روش های مولکولی شرح داده شده مورد آزمایش قرار گرفتند که دو مورد مثبت بود و انگل لیشمانیا میجر تشخیص و مورد تأیید قرار گرفت.

به منظور تعیین هویت و گونه انگل لیشمانیا، محصولات PCR مربوط به ۹۲ مورد مثبت آلودگی لیشمانیایی، توسط آنزیم اندونوکلاز BsuRI و با روش RFLP مورد هضم قرار گرفت و ۹۰ مورد لیشمانیا میجر تشخیص داده شد (جدول ۵). برای تأیید مجدد و تکمیل تعیین هویت انگل، ۸ نمونه از ۹۰ مورد محصول PCR ژن ITS1-5.8S-ITS2 rDNA لیشمانیا میجر، تعیین توالی گردید که هر ۸ مورد با توالی های ثبت شده لیشمانیا میجر این ژن در بانک جهانی ژن مطابقت داشت و لیشمانیا میجر در نمونه های انسانی در شرق استان گلستان مجدداً تأیید شد. دو مورد مثبت با آلودگی لیشمانیایی توسط آنزیم اندونوکلاز BsuRI و با روش RFLP مورد هضم قرار گرفت؛ ولی لیشمانیا میجر تشخیص داده نشد که این دو نمونه نیز برای تعیین توالی ارسال گردید. برای هر دو نمونه، توالی های حاصل قابل خواندن نبود و تا این مرحله این دو مورد که به طور یقین لیشمانیا میجر نبودند؛ تعیین گونه نشد و هویت انگل مشخص نگردید. نوکلئوتیدها و کروماتوگراف نمونه های تعیین توالی شده موارد مثبت لیشمانیا از افراد مثبت در شکل های ۲ و ۳ قابل مشاهده است.

نبودند؛ به طور مستقیم و بدون کلون کردن تعیین توالی شدند. برای این منظور ابتدا محصول PCR خالص سازی شد. سپس یک صد نانوگرم از DNA خالص برای هر نمونه برای تعیین توالی DNA با کیت ABI Prism® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (شرکت Applied Biosystems، آمریکا) و دستگاه 373/377 sequencing systems (ABI، PE Applied Biosystems) (شرکت Applied Biosystems، آمریکا) مورد استفاده قرار گرفت. به منظور وارد کردن توالی DNA برای تمام نمونه های سکانس شده، تنظیم توالی و تطبیق نوکلئوتیدها با کروماتوگرافی هر نمونه، از نرم افزار Sequencer™ 4.1.4 استفاده شد. برای آنالیزهای فیلوژنتیکی نیز از نرم افزار Phylogenetic analysis using parsimony یا PAUP* استفاده شد.

یافته ها

در مجموع از ۱۲۱ فرد مشکوک به بیماری لیشمانیوز جلدی روستایی، در ۱۱ روستا از توابع شهرستان مراوه تپه و ۸ روستا از توابع شهرستان گنبد و نیز شهرهای مراوه تپه و گنبد، نمونه برداری به عمل آمد. گروه بندی سنی و جنس افراد در جدول ۲ آورده شده است. همچنین توزیع فراوانی تعداد و محل ضایعات براساس گروه سنی در جدول ۳ اشاره شده است.

انگل لیشمانیا در نمونه های ۱۱۳ نفر (۹۳/۴ درصد) از ۱۲۱ مورد مشکوک با روش های میکروسکوپی با وفور متفاوت مشاهده گردید (جدول ۴).

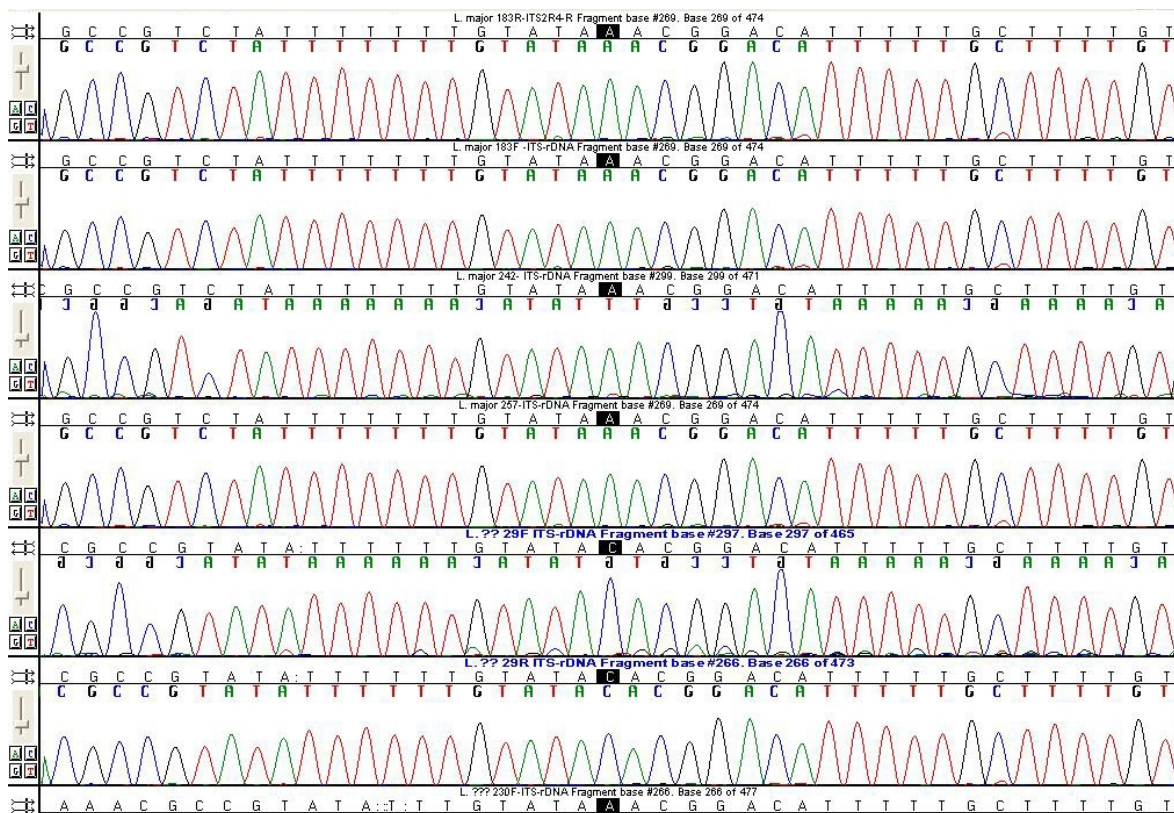
جدول ۲: فراوانی نمونه‌های جمع‌آوری شده از شرق استان گلستان برحسب گروه سنی و جنس در سال‌های ۱۳۸۱-۸۹

گروه سنی (سال)	زن تعداد (درصد)	مرد تعداد (درصد)
کمتر از ۱	۹ (۵۲/۹)	۸ (۴۷/۱)
۱-۳	۱۰ (۴۳/۵)	۱۳ (۵۶/۵)
۳-۵	۱۱ (۴۷/۸)	۱۲ (۵۲/۲)
۵-۱۰	۱۹ (۶۱/۳)	۱۲ (۳۸/۷)
۱۰-۱۵	۱ (۱۶/۷)	۵ (۸۳/۳)
۱۵-۲۵	۳ (۳۰)	۷ (۷۰)
بیش از ۲۵	۵ (۴۵/۵)	۶ (۵۴/۵)
جمع کل	۵۸ (۴۷/۹)	۶۳ (۵۲/۱)

جدول ۳: فراوانی نمونه‌های جمع‌آوری شده از شرق استان گلستان برحسب گروه سنی، تعداد و محل ضایعات در سال‌های ۱۳۸۱-۸۹

گروه سنی (سال)	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	* نامشخص	سر و گردن	تن	دست	یا
کمتر از ۱	۶	۳	۰	۱	۰	۰	۰	۷	۱۱	۰	۲	۴
۱-۳	۱۰	۳	۴	۲	۰	۱	۰	۳	۱۳	۴	۷	۸
۳-۵	۹	۵	۳	۰	۱	۱	۰	۴	۱۱	۲	۵	۱۱
۵-۱۰	۱۶	۹	۰	۱	۰	۰	۱	۴	۱۳	۱	۱۸	۸
۱۰-۱۵	۱	۲	۱	۱	۰	۰	۰	۱	۲	۱	۳	۲
۱۵-۲۵	۳	۳	۱	۰	۲	۰	۰	۱	۳	۱	۶	۵
بیش از ۲۵	۱	۲	۰	۱	۰	۰	۱	۶	۱	۲	۷	۳
جمع کل	۴۶	۲۷	۹	۶	۳	۲	۲	۲۶	۵۴	۱۱	۴۸	۴۱
تعداد (درصد)	(۳۸)	(۲۲/۳)	(۷/۴)	(۵)	(۲/۵)	(۱/۶)	(۱/۶)	(۲۱/۵)	(۳۵/۱)	(۷/۱)	(۳۱/۲)	(۲۶/۶)

* نامشخص: قابل شمارش نبودن ضایعات و یا وجود ضایعات در محل‌هایی از بدن که بیمار تمایلی به معاینه نداشت.



شکل ۲: کروماتوگرام ژن ITS-rDNA توالی‌های لیثمانیا میجر و ۲ نمونه غیر لیثمانیا میجر چهار ردیف کروماتوگرام بالایی مربوط به نمونه‌های لیثمانیا میجر و دو ردیف پایینی مربوط به نمونه‌های غیر لیثمانیا میجر است.

جدول ۴: مقایسه نتایج آزمایشات میکروسکوپی انجام شده بر روی نمونه‌های انسانی جمع‌آوری شده از شرق استان گلستان در سال‌های ۱۳۸۸-۸۹

شهرستان	روستا	تعداد نمونه‌ها	لیشمانیا منفی تعداد (درصد)*	۱ +	۲ +	۳ +	۴ +	۵ +	۶ +
مراوه‌تپه	هوتن	۲۷	۲ (۷/۴)	۱ (۳/۷)	۳ (۱۱/۱)	۳ (۱۱/۱)	۵ (۱۸/۵)	۱۰ (۳۷)	۳ (۱۱/۱)
	آی تهر	۲	۰	۰	۰	۱ (۵۰)	۰	۱ (۵۰)	۰
	کرنه	۳۱	۰	۱ (۳/۲)	۲ (۶/۴)	۴ (۱۲/۹)	۱۲ (۳۸/۷)	۱۰ (۳۲/۲)	۲ (۶/۴)
	نارلی داغ	۱	۰	۰	۱	۳ (۲۵)	۱ (۸/۳)	۰	۰
	قره گل	۱۲	۰	۳ (۲۵)	۵ (۴۱/۷)	۳ (۲۵)	۱ (۸/۳)	۰	۰
	همت آباد	۱	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰
	آق تقه	۳	۲ (۶۶/۷)	۱ (۳۳/۳)	۰	۰	۰	۰	۰
	سوزش	۴	۲ (۵۰)	۰	۰	۱ (۲۵)	۱ (۲۵)	۰	۰
	جاییلی	۱	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۰
	قازانقایه	۱	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰
گنبد کاووس	گویندر	۱	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	شهر مراوه‌تپه	۴	۰	۰	۱ (۲۵)	۱ (۲۵)	۲ (۵۰)	۰	۰
	ترشکلی	۱	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰
	قولاق بورنه	۱	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰
	چیرقویمه	۲	۰	۰	۰	۱ (۵۰)	۱ (۵۰)	۰	۰
	دانش برون	۸	۰	۵ (۶۲/۵)	۲ (۲۵)	۱ (۱۲/۵)	۰	۰	۰
	دزالوم	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱
	ارمی آباد	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۰
	اینچه برون	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱
	دارکلاته	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱
* نامشخص		۱۶	۰	۱ (۶/۲۵)	۲ (۱۲/۵)	۵ (۳۱/۲۵)	۳ (۱۸/۷۵)	۴ (۲۵)	۱ (۶/۲۵)
جمع کل (درصد)		۱۲۱	۸ (۶/۶)	۱۳ (۱۰/۷)	۱۸ (۱۴/۹)	۲۱ (۱۷/۴)	۲۶ (۲۱/۵)	۲۶ (۲۱/۵)	۹ (۷/۴)

* درصد با مقدار ۱۰۰ در جدول حذف گردید.

* نامشخص: نمونه‌های جمع‌آوری شده از مرکز بهداشت شهرستان‌های گنبد کاووس و مراوه‌تپه که روستای محل سکونت فرد مشکوک به بیماری قید نشده بود.

جدول ۵: مقایسه نتایج آزمایشات ملکولی انجام شده بر روی نمونه‌های انسانی جمع‌آوری شده از شرق استان گلستان در سال‌های ۱۳۸۸-۸۹

شهرستان	روستا	تعداد نمونه‌ها	PCR با هدف قراردادن ژن ITS-rDNA تعداد (درصد)*	RFLP با آنزیم BsuRI تعداد (درصد)*	سایر گونه‌ها
مراوه تپه	هوتن	۲۷	۱۲ (۴۴/۴)	۱۵ (۵۵/۶)	۰
	آی تهر	۲	۲	۰	۰
	کرنه	۳۱	۶ (۱۹/۴)	۲۵ (۸۰/۶)	۰
	نارلی داغ	۱	۰	۱	۰
	قره گل	۱۲	۰	۱۲	۰
	همت آباد	۱	۰	۱	۰
	آق تقه	۳	۰	۳	۰
	سوزش	۴	۲ (۵۰)	۲ (۵۰)	۰
	جاییلی	۱	۰	۱	۰
	قازانقایه	۱	۱	۰	۰
گنبد کاووس	گویندر	۱	۱	۰	۰
	شهر مراوه تپه	۴	۰	۴	۰
	ترشکلی	۱	۰	۱	۰
	قولاق بورنه	۱	۱	۰	۰
	چیرقویمه	۲	۰	۲	۰
	دانش برون	۸	۱ (۱۲/۵)	۷ (۸۷/۵)	۰
	دزالوم	۱	۰	۱	۰
	ارمی آباد	۱	۰	۱	۰
	اینچه برون	۱	۱	۰	۰
	دارکلاته	۱	۰	۱	۰
* نامشخص		۱۶	۲ (۱۲/۵)	۱۴ (۸۷/۵)	۱ (۷/۱)
جمع کل (درصد)		۱۲۱	۲۹ (۲۴)	۹۲ (۷۶)	۲ (۲/۲)

* درصد با مقدار ۱۰۰ در جدول حذف گردید.

* نامشخص: نمونه‌های جمع‌آوری شده از مرکز بهداشت شهرستان‌های گنبد کاووس و مراوه‌تپه که روستای محل سکونت فرد مشکوک به بیماری قید نشده بود.

L. major 74 ITS-rDNA	CCCGCCAAAAACCGAAACGCCGCTATTTTTTTGTATAAACGGACATTTTGGCTTTTGTGTATAGGC::G::GTGCGTTCTACAAACGTCGATCGG
L. major 88 ITS-rDNA	CCCGCCAAAAACCGAAACGCCGCTATTTTTTTGTATAAACGGACATTTTGGCTTTTGTGTATAGGC::G::GTGCGTTCTACAAACGTCGATCGG
L. major 112 ITS-rDNA	CCCGCCAAAAACCGAAACGCCGCTATTTTTTTGTATAAACGGACATTTTGGCTTTTGTGTATAGGC::G::GTGCGTTCTACAAACGTCGATCGG
L. major 137 ITS-rDNA	CCCGCCAAAAACCGAAACGCCGCTATTTTTTTGTATAAACGGACATTTTGGCTTTTGTGTATAGGC::G::GTGCGTTCTACAAACGTCGATCGG
L. major 183R-ITS2R	CCCGCCAAAAACCGAAACGCCGCTATTTTTTTGTATAAACGGACATTTTGGCTTTTGTGTATAGGC::G::GTGCGTTCTACAAACGTCGATCGG
L. major 183F-ITS-r	CCCGCCAAAAACCGAAACGCCGCTATTTTTTTGTATAAACGGACATTTTGGCTTTTGTGTATAGGC::G::GTGCGTTCTACAAACGTCGATCGG
L. major 242 ITS-rDNA	CCCGCCAAAAACCGAAACGCCGCTATTTTTTTGTATAAACGGACATTTTGGCTTTTGTGTATAGGC::G::GTGCGTTCTACAAACGTCGATCGG
L. major 242 cons IT	CCCGCCAAAAACCGAAACGCCGCTATTTTTTTGTATAAACGGACATTTTGGCTTTTGTGTATAGGC::G::GTGCGTTCTACAAACGTCGATCGG
L. major 257 ITS-rDNA	CCCGCCAAAAACCGAAACGCCGCTATTTTTTTGTATAAACGGACATTTTGGCTTTTGTGTATAGGC::G::GTGCGTTCTACAAACGTCGATCGG
L. ?? 29F ITS-rDNA	::C::CAAAAACCGAAACGCCGCTATA:TTTTTTGTATACACGGACATTTTGGCTTTTGTGTATAGGCGGTGTGTGCGTTCTATAACGTCGATCGG
L. ?? 29R ITS-rDNA	::C::CAAAAACCGAAACGCCGCTATA:TTTTTTGTATACACGGACATTTTGGCTTTTGTGTATAGGCGGTGTGTGCGTTCTATAACGTCGATCGG
L. ??? 230F ITS-rDNA	::C::CAAAAACCGAAACGCCGCTATA:TTTTTTGTATACACGGACATTTTGGCTTTTGTGTATAGGCGGTGTGTGCGTTCTATAACGTCGATCGG
L. ??? 230R ITS-rDNA	GCCAAAC:AAAACCGAAACGCCGCTATTTT::G:TATAAACGGACATTTTGGCTTTTGTGTATAGGC::G::GTGCG:T:TATAACGTCGATCGG
13 frag bases selected at consensus position 284	260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 CCCGCCAAAAACCGAAACGCCGCTATTTTTTTGTATAAACGGACATTTTGGCTTTTGTGTATAGGC::G::GTGCGTTCTACAAACGTCGATCGG

شکل ۳: سکانس نوکلئوتیدی های ژن ITS-rDNA توالی های لیشمانیا میجر و ۲ نمونه غیرلیشمانیا میجر
۹ ردیف بالایی مربوط به نمونه های لیشمانیا میجر و ۴ ردیف پایینی مربوط به سکانس های رفت و برگشت ۲ نمونه غیر میجر است که در جایگاه نوکلئوتیدی ۲۸۴ به جای C، نوکلئوتید A قرار دارد.

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که نمونه های جدا شده از انسان ها در این منطقه با مقایسه نتایج تعیین توالی انگل لیشمانیا با موارد ثبت شده در بانک جهانی ژن، از نوع لیشمانیا میجر می باشند.

تفاوت معنی داری میان توزیع فراوانی بیماران در دو جنس وجود نداشت؛ ولی فراوانی بیماری در سنین زیر ۵ سال و نیز در قسمت های باز بدن بیشتر از اندام های پوشیده بود که می تواند به دلیل در معرض قرار گرفتن نقاط باز بدن کودکان در برابر گزش پشه خاکی ناقل باشد. دلیل دیگر می تواند به خاطر ایجاد ایمنی نسبی در برابر گزش های مداوم پشه خاکی ها در دوران کودکی و از این رو مصونیت در افراد بزرگسال باشد. این یافته ها با مطالبی که پیش از این در مورد این منطقه منتشر شده و این منطقه را جزء مناطقی با بومی گرایی کم بیماری دانسته و توزیع بیماری در کودکان و بزرگسالان یکنواخت گزارش شده (۲۲)؛ مطابقت ندارد.

در این مطالعه شکل ظاهری اکثر زخم ها مرطوب و شبیه به زخم حاصل از لیشمانیا میجر بود. در موارد دیگری ظاهر ضایعه، خشک و شبیه به زخم ناشی از لیشمانیا تروپیکا بود؛ اما پس از آزمایشات مولکولی، گونه انگل لیشمانیا میجر تشخیص داده شد. لذا می توان نتیجه گرفت که ظاهر ضایعه نمی تواند ملاکی معتبر برای تشخیص عامل بیماری باشد و از این رو اهمیت روش های مولکولی و آنالیز سکانس های ژنومی لیشمانیا، برای تعیین هویت انگل دوچندان می شود.

علاوه بر استفاده از روش های مولکولی در این مطالعه، در به کارگیری روش های مولکولی فقط به تکثیر ژن لیشمانیا با روش PCR اکتفا نشد و پس از تکثیر با روش RFLP تحت هضم آنزیمی قرار گرفت و مورد تأیید قرار گرفت. تعدادی از نمونه های تأیید شده با روش RFLP و نیز ۲ مورد مشکوک برای تأیید قطعی، سکانس و تعیین توالی شدند. در این مطالعه لیشمانیا میجر شناسایی و

مورد تأیید قرار گرفت. چرا که پس از تعیین توالی و آنالیز با استفاده از نرم افزارهای مولکولی، با سکانس این ژن از لیشمانیا میجر در بانک جهانی ژن مقایسه گردید. سکانس حاصل از این مطالعه با لیشمانیا میجر به شماره دسترسی EF413075 ثبت شده در بانک جهانی ژن از اصفهان و دیگر کشورها از جمله سودان به شماره دسترسی AJ300481 (MHOM/SD/90/SUDAN3) صددرصد مطابقت داشت. همچنین آنالیزهای انجام شده با نرم افزار SequencherTm 4.1.4 مشخص کرد که سکانس لیشمانیا میجر به دست آمده در این مطالعه با سکانس ثبت شده از همین گونه از اصفهان به شماره دسترسی EF413078 در جایگاه نوکلئوتیدی ۱۸۴ تنها در یک نوکلئوتید تفاوت دارد و به جای G، A قرار گرفته است. مقایسه انجام شده با سکانس لیشمانیا میجر ثبت شده از کشور ترکمنستان به شماره دسترسی AJ272383 نشان از تفاوت در جایگاه نوکلئوتیدی ۲۵۴، ۳۳۰ و ۳۳۱ داشت.

در اکثر نقاط ایران مطالعات گسترده ای بر روی عامل لیشمانیوز جلدی در انسان انجام گرفته است که در بسیاری از موارد گونه انگل بدون تایپ، لیشمانیا میجر و یا لیشمانیا تروپیکا گزارش شده است (۲۳ و ۲۴). در برخی مطالعات انجام شده در مناطق اندمیک لیشمانیا میجر، علاوه بر عامل اصلی بیماری، لیشمانیا تورائیکا، لیشمانیا جریلی و لیشمانیای جدید نزدیک به لیشمانیا جریلی از ناقلین (پشه خاکی ها) یا مخازن حیوانی (جوندگان) گزارش شده است (۲۵ و ۲۶)؛ ولی تاکنون شناسایی این گونه ها در انسان از ایران و دیگر نقاط جهان گزارش نشده است. در این مطالعه ۲ مورد لیشمانیا مثبت که لیشمانیا میجر نبودند؛ تشخیص داده شد و علی رغم تلاش ها و چندین بار ارسال نمونه ها برای سکانس، توالی ها به طور کامل خوانا نبودند و هویت انگل لیشمانیا در این ۲ نمونه انسانی مشخص نشدند. شاید با آزمایش نمونه های بیشتر و یافتن گونه های انگل لیشمانیا غیر از میجر، هویت انگل های جدید و نقش آن در

در روش ملکولی مثبت تشخیص داده شدند.

نتیجه گیری

با مقایسه نتایج تعیین توالی انگل لیشمانیا در این مطالعه با موارد ثبت شده در بانک جهانی ژن، لیشمانیا میجر به طور قطع در انسان در منطقه مورد تایید قرار گرفت. با توجه به گزارش های مربوط به دیگر گونه های لیشمانیا در ناقلین و مخازن، این گونه ها در این مطالعه در انسان یافت نگردید. هرچند دو مورد غیر لیشمانیا میجر می تواند نشانی از آلودگی همزمان بیش از یک گونه لیشمانیا در انسان در منطقه باشد؛ اما با روش های به کار رفته در این مطالعه آلودگی همزمان دو لیشمانیا در یک فرد قابل تفکیک نبود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل بخشی از پایان نامه آقای احمد بقائی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته میکروبیولوژی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم بود که در آزمایشگاه سیستماتیک مولکولی انستیتو پاستور ایران انجام شد. بودجه این تحقیق از محل اعتبارات پژوهشی انستیتو پاستور ایران، (طرح مصوب ۳۶۷) تأمین شد.

بدین وسیله از آقایان محمد آخوندی، علی بردبار، مجتبی هدایتی، مهدی باغبان و خانم الناز علائی نوین همکاران آزمایشگاه سیستماتیک مولکولی انستیتو پاستور که در جمع آوری نمونه ها و فعالیت های آزمایشگاهی نقش شایانی داشتند؛ صمیمانه سپاسگزاری می نمایم. همچنین همکاری و هماهنگی های انجام شده توسط مسئولین و کارکنان محترم شبکه بهداشتی شهرهای گنبد کاووس و مراوه تپه موجب امتنان و سپاس نویسنده گان است.

References

1. Parvizi P, Ready PD. Nested PCRs and sequencing of nuclear ITS-rDNA fragments detect three Leishmania species of gerbils in sandflies from Iranian foci of zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Trop Med Int Health*. 2008 Sep;13(9):1159-71.
2. Mohebbi M, Hajjarian H, Hamzavi Y, Mobedi I, Arshi S, Zarei Z, et al. Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran. *Vet Parasitol*. 2005 May; 129(3-4):243-51.
3. Evans D, Godfrey D, Lanham S, Lanotte G, Modabber F, Schnur L. Handbook on isolation, characterization and cryopreservation of Leishmania. Geneva, Switzerland: WHO; 1989.
4. [No authors listed]. Control of the leishmaniasis. Report of a WHO Expert Committee. *World Health Organ Tech Rep Ser*. 1990; 793:1-158.
5. Schönian G, El Fari M, Lewin S, Schweynoch C, Presber W. Molecular epidemiology and population genetics in Leishmania. *Med Microbiol Immunol*. 2001 Nov;190(1-2):61-3.
6. Cupolillo E, Grimaldi Júnior G, Momen H, Beverley SM. Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of Leishmania. *Mol Biochem Parasitol*. 1995 Jul;73(1-2):145-55.
7. Dowlati Y, Firooz A. Leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol*.

دوام و حفظ بیماری در منطقه، مورد بازبینی قرار گیرد. چراکه عقیده بر این است که انگل لیشمانیای غیربیماری زا برای انسان مانند لیشمانیا تورانیکا و لیشمانیا جریلی در حفظ و دوام انگل لیشمانیا میجر در ناقلین و مخازن نقش اساسی دارند (۲۷).

چنانچه گونه های غیربیماری زای یافت شده انگل لیشمانیا در مخازن و ناقلین، در انسان نیز شناسایی گردد؛ باید نسبت به تلقی لیشمانیا میجر به عنوان تنها عامل بیماری لیشمانیوز جلدی نوع روستایی تجدید نظر نمود و گونه های غیرپاتوژن انگل لیشمانیا را نیز از این پس برای انسان بیماری زا محسوب کرد. این خود می تواند به علت تغییر در بیولوژی و شرایط اکولوژیک گونه های غیربیماری زای انگل لیشمانیا باشد (۲۸ و ۲۹).

برای کنترل بیماری لیشمانیوز، تعیین هویت انگل در انسان، ناقلین و مخازن ضروری است. چراکه ممکن است بیش از یک گونه از انگل عامل بیماری بوده و یا سایر گونه ها در تقویت بیماری زایی انگل نقش داشته باشند (۲۷ و ۲۸). لازم است در این زمینه مطالعات بیشتری صورت گیرد تا مشخص گردد که آیا تنها عامل لیشمانیوز جلدی نوع روستایی لیشمانیا میجر است یا دیگر گونه های لیشمانیا نیز در ایجاد این بیماری نقش ثانویه دارند.

در این مطالعه تعداد بیشتر موارد مثبت حاصل از مشاهده میکروسکوپی در مقایسه با روش مولکولی مربوط به مواردی بود که در ابتدای راه اندازی مراحل مختلف مولکولی برای اولین بار در آزمایشگاه انجام شد؛ اما پس از راه اندازی روش های مولکولی حتی تعدادی از موارد منفی تشخیص داده شده با روش میکروسکوپی؛

1997 Jul;37(1):139-40.

8. Tashakori M, Kuhls K, Al-Jawabreh A, Mauricio IL, Schönian G, Farajnia S, et al. Leishmania major: genetic heterogeneity of Iranian isolates by single-strand conformation polymorphism and sequence analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer. *Acta Trop*. 2006 Apr;98(1):52-8.
9. Edrissian Gh. [Visceral Leishmaniasis in Iran and the role of serological tests in the diagnosis and epidemiological studies]. *J Kerman Univ Med Sci*. 1996; 3(2): 97-108. [Article in Persian]
10. Seyed-Rashti MA, Nadim A. Epidemiology of cutaneous Leishmaniasis in Iran. B. Khorasanarea, part 1: the reservoirs. *Bull Soc Pathol Exot*. 1967;60:510-18.
11. Parvizi P, Hedayati M. [Leishmania infections in rodents, reservoir hosts of zoonotic cutaneous leishmaniasis in turkemen sahara, gonbad, golastan province] *J Guilan Univ Med Sci*. 2010; 18(72):30-8. [Article in Persian]
12. Mirzaei A, Rouhani S, Taherkhani H, Farahmand M, Kazemi B, Hedayati M, et al. Isolation and detection of Leishmania species among naturally infected Rhombomys opimus, a reservoir host of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Turkmen Sahara, North East of Iran. *Exp Parasitol*. 2011 Dec;129(4):375-80.
13. Parvizi P, Taherkhani H, Ready PD. Phlebotomus caucasicus and Phlebotomus mongolensis (Diptera: Psychodidae): indistinguishable by the mitochondrial cytochrome b gene in Iran.

Bull Entomol Res. 2010 Aug; 100(4):415-20.

14. Ardehali S, Moattari A, Hatam GR, Hosseini SM, Sharifi I. Characterization of *Leishmania* isolated in Iran: 1. Serotyping with species specific monoclonal antibodies. *Acta Trop*. 2000 May; 75(3):301-7.

15. Hashemi SN, Mohebbali M, Mansouri P, Bairami A, Hajjaran H, Akhoundi B, et al. Comparison of leishmanin skin test and direct smear for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Acta Med Iran*. 2011;49(3):136-41.

16. Davami MH, Motazedian MH, Sarkari B. The changing profile of cutaneous leishmaniasis in a focus of the disease in Jahrom district, southern Iran. *Ann Trop Med Parasitol*. 2010 Jul; 104(5):377-82.

17. Hatam GR. [Isolation of *Leishmania* parasite]. In: Hatam GR, Ardehali S, Motazedian MH, Sadjjadi SM, Fakoorziba MR. [The methods of isolation and characterization of *Leishmania* parasite]. 1st. Shariz: Shiraz University of Medical Sciences. 2005; pp:15-20. [Persian]

18. Worth Health Organization. Basic laboratory methods in medical parasitology. 1st. Geneva: WHO. 1991.

19. Kazemi-Rad E, Mohebbali M, Hajjaran H, Rezaei S, Mamishi S. Diagnosis and Characterization of *Leishmania* Species in Giemsa-Stained slides by PCR-RFLP. *Iran J Public Health*. 2008;37(1): 54-60.

20. Parvizi P, Moradi G, Akbari G, Farahmand M, Ready PD, Piazak N, et al. PCR detection and sequencing of parasite ITS-rDNA gene from reservoirs host of zoonotic cutaneous leishmaniasis in central Iran. *Parasitol Res*. 2008 Nov; 103(6):1273-8.

21. Gadisa E, Genetu A, Kuru T, Jirata D, Dagne K, Aseffa A, et al. *Leishmania* (Kinetoplastida): species typing with isoenzyme and PCR-RFLP from cutaneous leishmaniasis patients in Ethiopia.

Exp Parasitol. 2007 Apr;115(4):339-43.

22. Javadian E. [Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Iran]. In: Nadim A, Javadian E, Mohebbali M, Zamen-Momeni A. [*Leishmania* parasite and leishmaniasis]. 3rd. Tehran: Academic Press. 2008; pp:203-5. [Persian]

23. Shahbazi F, Shahabi S, Kazemi B, Mohebbali M, Abadi AR, Zare Z. Evaluation of PCR assay in diagnosis and identification of cutaneous leishmaniasis: a comparison with the parasitological methods. *Parasitol Res*. 2008 Oct;103(5):1159-62.

24. Karamian M, Motazedian MH, Fakhari M, Pakshir K, Jowkar F, Rezaeezad H. Atypical presentation of Old-World cutaneous leishmaniasis, diagnosis and species identification by PCR. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2008 Aug;22(8):958-62.

25. Hajjaran H, Mohebbali M, Alimoradi S, Abaei MR, Edrissian GH. Isolation and characterization of pathogenic *Leishmania* *turanica* from *Nesokia indica* (Rodentia, Muridae) by PCR-RFLP and ITS1 sequencing in Iran. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009 Nov; 103(11):1177-9.

26. Akhavan AA, Mirhendi H, Khamesipour A, Alimohammadian MH, Rassi Y, Bates P, et al. *Leishmania* species: detection and identification by nested PCR assay from skin samples of rodent reservoirs. *Exp Parasitol*. 2010 Dec;126(4):552-6.

27. Strelkova MV, Eliseev LN, Ponirovsky EN, Dergacheva TI, Annacharyeva DK, Erokhin PI, et al. Mixed leishmanial infections in *Rhombomys opimus*: a key to the persistence of *Leishmania* major from one transmission season to the next. *Ann Trop Med Parasitol*. 2001 Dec;95(8):811-9.

28. Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol*. 1990 Jan;4(1):1-24.

29. Killick-Kendrick R. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol*. 1999 May-Jun;17(3):279-89.