

## تعیین هویت مولکولی عوامل ایجادکننده لیشمانیوز جلدی در شهرستان بیرجند

مهدی کرمیان<sup>۱</sup>، محمد صدیق فاروقی بجد<sup>۲</sup>، مینا همتی<sup>۳</sup>، سید علیرضا سعاد التجو<sup>۴</sup>، درویشعلی براتی<sup>۵</sup>

### چکیده

زمینه و هدف: لیشمانیوز جلدی یا سالک، در مناطق مختلفی از ایران آندمیک است. این بیماری، در سالیان گذشته به صورت تک گیر در بیرجند دیده شده است، اما به نظر می‌رسد از حدود پنج سال قبل، کانونی پایدار از آن در منطقه پدید آمده باشد. مطالعه حاضر، برای تعیین گونه انگل‌های لیشمانیا در ضایعات جلدی بیماران ساکن شهرستان بیرجند انجام شده است.

روش تحقیق: در این مطالعه مقطعی، نمونه‌های ضایعات جلدی بیماران مشکوک به سالک طی ۵ سال گذشته، برابر با ۸۰ نمونه که در مرکز بهداشت شهرستان بیرجند موجود بود، مورد مطالعه قرار گرفت. بخش متغیر از DNA کیتوپلاستی انگل لیشمانیا (KDNa) و نیز بخش ITS1 از DNA ریبوزومی این انگل‌ها، توسط روش PCR تکثیر گردید و از روش PCR-RFLP، بر روی محصولات بخش ITS1 برای تعیین هویت انگل‌ها استفاده شد.

یافته‌ها: تمامی نمونه‌های با تشخیص مثبت میکروسکوپی، توسط روش PCR-RFLP بر روی قطعه ITS1 از DNA ریبوزومی تعیین گونه گردیدند، اما روش KDNa PCR توانست، تنها ۴۶ نمونه را تعیین گونه نماید. در مجموع، ۸ بیمار (۱۰٪)، مبتلا به لیشمانیا مژور و ۷۲ نفر (۹۰٪)، آلوده به لیشمانیا تروپیکا تشخیص داده شدند.

نتیجه‌گیری: روش PCR-RFLP قطعه ITS1، دارای حساسیت کامل بوده و برای تشخیص لیشمانیوز و تعیین گونه سریع انگل‌های عامل بیماری توصیه می‌شود.

بر اساس نتایج این تحقیق هر دو فرم بیماری سالک یعنی ACL (با مخزن انسانی) ناشی از لیشمانیا تروپیکا و ZCL (دارای مخازن جانوری) متناسب از لیشمانیا مژور در بیرجند موجود است.

**واژه‌های کلیدی:** لیشمانیا تروپیکا، لیشمانیا مژور، PCR، بیرجند، نمونه‌های ضایعه جلدی

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، ۱۳۹۲؛ ۲۰(۲): ۱۸۳-۱۹۰.

دریافت: ۱۳۹۱/۱۲/۲۳ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۴/۱۲

<sup>۱</sup> نویسنده مسؤول، استادیار انگل‌شناسی، مرکز تحقیقات هپاتیت، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران.

آدرس پستی: بیرجند- خیابان غفاری- دانشگاه علوم پزشکی بیرجند- دانشکده پزشکی  
تلفن: ۰۴۳۳۰۰۴-۰۶۱-۴۴۳۳۰۰۴. نامبر: ۰۶۱-۴۴۳۳۰۰۴. پست الکترونیکی: karamianm@yahoo.com

<sup>۲</sup> دکترای عمومی، مرکز بهداشت شهرستان بیرجند، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران.

<sup>۳</sup> استادیار بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران.

<sup>۴</sup> مریب پرستاری، دانشکده پرستاری و مامایی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران.

<sup>۵</sup> کارشناس آزمایشگاه، مرکز بهداشت شهرستان بیرجند، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران.

## مقدمه

مطالعات مولکولی دارند شامل: DNA کیتوپلاستی انگل و DNA ITS از DNA ریبوزومی آن است (۹). DNA کیتوپلاستی، با دارابودن هزاران نسخه DNA حلقوی conserve و minicircles) که هر یک شامل دو بخش variable تشخیصی و تعیین گونه می‌باشد؛ از سوی دیگر، بخش ITS<sup>۱</sup> به واسطه کپی‌های متعدد آن در ژنوم انگل و توالی‌های تکراری، کاربرد فراوانی برای تاکسونومی دارد.

در سالیان گذشته، بیماری سالک به صورت تک‌گیر در مناطقی از بیرجند مشاهده شده و تصوّر بر این بوده است که بیماری، به صورت وارداتی، تنها در مسافران به مناطق لیشمانیاخیز دیده می‌شود. اما یافته‌های سالیان اخیر، حاکی از ظهور کانونی پایدار از بیماری در بیرجند بوده و هر ساله موارد متعددی از آن در ساکنین بومی شهر بیرجند گزارش می‌گردد. میزان بروز بیماری سالک در بیرجند طی ۵ سال گذشته، با توجه به موارد مثبت گزارش شده توسط مرکز بهداشت شهرستان بیرجند، ۲۱۲ نفر بوده است. هدف از مطالعه حاضر، تعیین گونه انگل‌های لیشمانیا که طی ۵ سال اخیر سبب بیماری سالک در ساکنین شهر بیرجند شده‌اند، با استفاده از روش‌های مولکولی بوده است.

## روش تحقیق

### نمونه‌ها

در این مطالعه، کلیه نمونه‌های مستقیم تهیه شده از ضایعات جلدی افراد مشکوک به لیشمانیوز جلدی که در فاصله سال‌های ۱۳۸۷ الی ۱۳۹۱، به مرکز بهداشت شهرستان بیرجند مراجعه کرده و نتیجه بررسی میکروسکوپی آنها مثبت ذکر شده بود، در مجموع برابر با ۱۲۰ نمونه، مورد بررسی قرار گرفتند. اطلاعات بیماران، بر اساس فرم بررسی انفرادی بیماری که در مرکز بهداشت برای تمام بیماران تکمیل شده بود، استخراج گردید.

لیشمانیوز، یک بیماری عفونی است که در اثر خونخواری پشه‌خاکی‌های جنس فلوبوتوموس در دنیای قدیم و لوتزومیا در دنیای جدید، به انسان منتقل می‌شود.

ایران یکی از ۱۰ کشور در جهان است که بیشترین موارد بیماری لیشمانیوز جلدی در آن گزارش می‌گردد (۱). عامل اصلی ایجاد فرم زئونوز بیماری (ZCL) در ایران، انگل لیشمانیامازور (*Leishmania major*) بوده که دارای مخازن متعدد جانوری به‌ویژه انواع جوندگان است (۲)؛ از طرف دیگر لیشمانیا تروپیکا (*L. tropica*)، گونه‌ای است که عامل عمدۀ فرم با مخزن انسانی بیماری (ACL) در ایران و بسیاری از کشورهای دیگر است. البته مواردی از لیشمانیوز احشائی ایجادشده به‌وسیله این دو انگل، از ایران گزارش گردیده‌اند (۳، ۴)؛ در مقابل، لیشمانیا لینفانتوم که عامل اصلی لیشمانیوز احشائی در ایران محسوب می‌شود، در بسیاری از کشورهای اروپایی، تنها، فرم لیشمانیوز جلدی را پدید آورده و مواردی از سالک ناشی از آن در ایران هم گزارش گردیده است (۵).

اهمیت تعیین هویت انگل‌های عامل ایجاد لیشمانیوز و تأثیری که در پیشگیری، کنترل و درمان بیماری دارد، سبب گردیده است که روش‌های مختلفی برای تمایز گونه این انگل‌ها به کار گرفته شود، از جمله: روش کشت انگل، تزریق به حیوان آزمایشگاهی، روش ایزوآنزیم و روش‌های مولکولی PCR. از جمله کاربردی‌ترین روش‌های مولکولی، روش PCR است که دارای حساسیّت و اختصاصیّت قابل توجه می‌باشد (۷). با استفاده از این تکنیک، می‌توان حتی با استفاده از نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده با گیمسای بیماران مبتلا به سالک، گونه انگل‌های عامل بیماری را تعیین نمود. این نمونه‌های اسمیر مستقیم از افراد مشکوک به لیشمانیوز جلدی، به سهولت تهیه گردیده و برای آزمایش PCR، تا سال‌های متمادی قابل استفاده خواهند بود (۸).

دو قطعه ژنومی از انگل لیشمانیا که بیشترین کاربرد را در

<sup>۱</sup> Internal Transcribed Spacer

LINR4 و LIN17 minicircle که قسمت متغیر از DNA کیتوپلاستی لیشمانیا را تکثیر می‌دهند، انجام گردید (۸). طول این قطعه، در انواع مختلف لیشمانیا متفاوت بود و با توجه به طول حرکت باند، طی الکتروفورز بر ژل آکاروز گونه لیشمانیای مربوط به هر ایزوله شناسایی گردید. طول این قطعه در مورد لیشمانیا تروپیکا در حدود ۷۵۰ جفت باز و در لیشمانیا ماذور ۶۸۰ جفت باز است.

در روش PCR دوم، با استفاده از پرایمرهای L5.8S و LITSR، بخشی از DNA ریبوزومی ۵.8S و نیز کل قطعه ITS1 ریبوزومی در انگل‌های لیشمانیای مورد بررسی، تکثیر یافته‌نده (۱۱). طول این قطعه در انواع مختلف لیشمانیا، در حدود ۳۰۰bp است. در این شرایط، برای تفکیک انواع مختلف لیشمانیا، از تکنیک PCR-RFLP با استفاده آنزیم آنزیم محدودکننده HaeIII است، استفاده گردید (۱۲). الگوی هضم DNA توسط این آنزیم، در مورد انواع مختلف لیشمانیا از جمله لیشمانیا ماذور و لیشمانیا تروپیکا متفاوت بود و بر اساس الکتروفورز محصول بر روی ژل آکاروز، انواع مختلف انگل جداسازی شدند.

Eppendorf Thermal Cycler (Mastercycler EP Gradient S, Germany) برای PCR نمونه‌ها، از دستگاه ساخت شرکت Biometra آلمان استفاده شد. ایزولهای استاندارد بکاررفته برای مقایسه باندهای نمونه‌های PCR شده شامل: MHOM/SU/71/K27 ایزوله استاندارد لیشمانیاتروپیکا و MHOM/SU/73/5ASKH ایزوله استاندارد لیشمانیاماذور بودند. مارکر مورد استفاده برای الکتروفورز افقی Mid Range DNA Ladder (100bp-3kb) ساخت شرکت Jena Bioscience آلمان بود.

### DNA Sequencing

برای تأیید تشخیص گونه‌ای، تعدادی از نمونه‌های تکثیریافته توسط پرایمرهای L5.8S و LITSR به صورت

بیمارانی که مشخصات آنها به درستی ثبت نگردیده بود، از مطالعه حذف شدند. اسمیرهای رنگ آمیزی شده، توسط میکروسکوپ نوری مشاهده گردید و وجود جسم لیشمان در آنها مورد بررسی قرار گرفت. در مجموع، ۸۰ اسمیر مستقیم با رنگ آمیزی گیمسا و تشخیص میکروسکوپی مثبت، ۳۰ اسمیر منفی از نظر تشخیص میکروسکوپی مربوط به افراد مشکوک به سالک و ۱۰ اسمیر متعلق به سایر بیماری‌های جلدی غیر از سالک، مورد مطالعه قرار گرفتند.

### استخراج DNA

ابتدا سطح هر نمونه، توسط تیغه جراحی مجزا تراشیده شد و تحت شرایط استریل، به میکروتیوب منتقل گردید. استخراج DNA از این نمونه‌ها، با استفاده از کیت استخراج AccuPrep® Genomic DNA به روش ستونی (Extraction Kit, Bioneer, South Korea) دستورالعمل مندرج در کیت انجام گردید؛ بدین ترتیب که ابتدا به هر میکروتیوب، ۲۰۰ میکرولیتر بافر هضم‌کننده حاوی پروتئیناز K افزوده گردید و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند؛ سپس Binding buffer افزوده شد و پس از سانتریفوژ با دور بالا و اضافه نمودن ایزوپروپانول و پیپتینگ، محتويات لوله‌ها به تیوب‌های واحد فیلتر ستونی انتقال یافتند. پس از دو بار شستشو با بافرهای اختصاصی و سانتریفوژ با دور بالا، ستون‌ها به میکروتیوب‌های استریل منتقل گردید و با افزودن ۲۰۰ میکرولیتر بافر TE و حل شدن نمونه‌ها در این بافر، محلول نهایی به کمک سانتریفوژ در میکروتیوب‌ها جمع‌آوری گردید و به عنوان محلول DNA در PCR استفاده گردید. محلول‌های DNA پس از استفاده، در دمای -۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

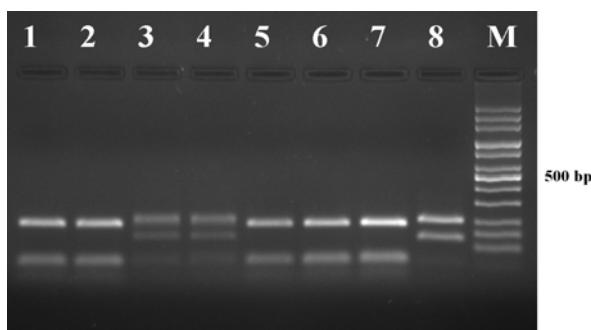
### روش‌های PCR و PCR-RFLP<sup>۱</sup>

Mحلول DNA به دست آمده، برای دو فرآیند PCR استفاده شد. ابتدا PCR اختصاصی، با استفاده از پرایمرهای

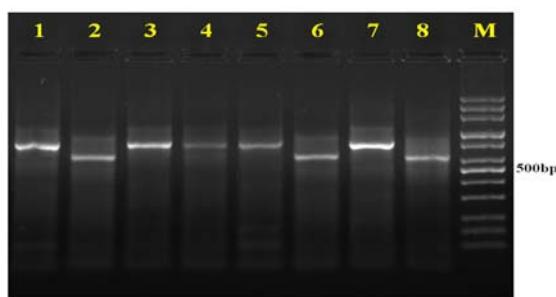
<sup>۱</sup> Restriction Fragment Length Polymorphism

پزشک با سابقه ظهور ضایعه در بیماران مبتلا به لیشمانیاماژور، نشان داد که کلیه این بیماران، در محدوده ماههای مرداد تا مهر، مورد گزش پشه‌خاکی آلوده به انگل قرار گرفته‌اند؛ در حالی که در مورد افراد مبتلا به لیشمانیاتروپیکا، گزش پشه آلوده در تمام ماههای سال اتفاق نداشت.

نتایج ITS1 قطعه DNA Sequencing مربوط به ۲۰ بیمار، صحّت تعیین گونه توسط روش PCR-RFLP مربوط به این قطعات را تأیید نمود. توالی نوکلئوتیدی این قطعات، در بانک ژنی NCBI آمریکا با کدهای شناسایی KC505421 و KC505440 ثبت گردیده و قابل دسترسی است.



تصویر ۱- الکتروفورزیس محصولات هضم آنزیمی بخش ITS1 از DNA ریبوزومی انگل‌های لیشمانیا توسط آنزیم HaeIII بر روی ژل آگاروز. ردیف ۱ تا ۶ نمونه‌های ضایعات جلدی بیماران. ردیف ۷ و ۸ بهترتیب ایزوله استاندارد لیشمانیاتروپیکا و لیشمانیاماژور. ردیف M مارکر وزنی DNA (100-3000bp) شرکت Jena Bioscience آلمان.



تصویر ۲- الکتروفورزیس محصولات PCR بخش متغیر KDNA انگل‌های لیشمانیا بر روی ژل آگاروز. ردیف ۱ تا ۶ نمونه‌های ضایعات جلدی بیماران. ردیف ۷ و ۸ بهترتیب ایزوله استاندارد لیشمانیاتروپیکا و لیشمانیاماژور. ردیف M مارکر وزنی DNA (100-3000bp) شرکت Jena Bioscience آلمان.

دو طرفه و توسط همین دو پرایمر، توسط کمپانی Bioneer کشور کره جنوبی تعیین توالی گردیدند. نتایج sequencing توسط نرم‌افزارهای Bioedit v.1.7.4 و ChromasPro v.7.0.9 بررسی شد و هم‌ردیفی در مورد توالی‌های دو طرفه انجام گردید. نتایج به دست آمده، با اطلاعات موجود در بانک ژنی NCBI مقایسه و ثبت گردیدند.

تجزیه و تحلیل اطلاعات به دست آمده از بررسی پرونده بیماران و نتایج تعیین گونه‌ای، با استفاده از نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۱۳) و با استفاده از آمار توصیفی و آزمون‌های آماری کای‌اسکوئر و تست دقیق فیشر در سطح  $\alpha=0.05$  آنالیز گردید.

## یافته‌ها

روش PCR اختصاصی برای تکثیر قطعه ITS1 انگل‌های لیشمانیا، در مورد تمام ۸۰ نمونه مثبت میکروسکوپی (۱۰۰٪) و نیز ۱۳ نمونه از ۳۰ نمونه منفی از نظر تشخیص میکروسکوپی (۴۳٪)، باند اختصاصی ایجاد نمود و در نمونه‌های مربوط به سایر بیماری‌های جلدی، باندی ایجاد نکرد. با اثردادن آنزیم BsuRI بر روی محصولات حاصل از این روش PCR و مقایسه الگوی باندی ایجادشده با استانداردهای مربوط به انواع مختلف لیشمانیا، گونه‌های آلوده‌کننده انگل در بیماران مشخص گردیدند (تصویر ۱). اما روش PCR تکثیردهنده KDNA انگل‌ها، تنها در مورد ۴۶ نمونه، پس از الکتروفورز بر ژل آگاروز، باند اختصاصی ایجاد کرد (۵۷٪) و قادر به تعیین گونه آنها بود (تصویر ۲).

از مجموع ۸۰ نمونه میکروسکوپی مثبت مورد بررسی، ۸ بیمار، مبتلا به لیشمانیاماژور تشخیص داده شدند (۱۰٪) و ۷۲ بیمار دیگر به لیشمانیاتروپیکا مبتلا بودند (۹۰٪). در مقایسه عوارض کلینیکی ایجادشده در بیماران با گونه انگل عامل بیماری (جدول ۱)، تفاوت معنی‌داری بین دو گونه انگل مشاهده نگردید؛ از سوی دیگر، مقایسه زمان مراجعه به

جدول ۱- فراوانی مطلق و نسبی گونه های مختلف عامل بیماری با توجه به اطلاعات کلینیکی بدست آمده از بیماران

نام متغیر	زیر گروه	لیشمانياماژور (درصد) فراوانی	لیشمانياتروپيكا (درصد) فراوانی	سطح معنی داری آزمون دقیق فیشر
جنسیت	مرد	۴ (۵۰)	۲۹ (۴۶/۸)	۱
	زن	۴ (۵۰)	۳۳ (۵۳/۲)	
محل سکونت	شهر	۶ (۷۵)	۵۱ (۷۰/۸)	۱
	روستا	۲ (۲۵)	۲۱ (۲۹/۲)	
تعداد ضایعه جلدی	۱-۲	۴ (۵۰)	۵۸ (۸۰/۶)	۰/۰۷
	$\geq 3$	۴ (۵۰)	۱۴ (۱۹/۴)	
محل ضایعه	صورت و گردن	۱ (۱۲/۵)	۱۹ (۲۶/۴)	۰/۸۱
	دست و پا	۷ (۸۷/۵)	۴۸ (۶۶/۷)	
طول دوره بروز ضایعه (ماه)	هر دو	-	۵ (۶/۹)	۰/۴۱
	۱-۲	۵ (۶۲/۵)	۲۷ (۳۷/۵)	
	۳-۶	۲ (۲۵)	۳۴ (۴۷/۲)	
	$> 6$	۱ (۱۲/۵)	۱۱ (۱۵/۳)	

مربوط به افراد مشکوک به لیشمانيوز جلدی که در آزمایش مستقیم میکروسکوپی آنها، انگلی تشخیص داده نشده بود، ۱۳ نمونه (۴۳/۳٪) توسط روش PCR-RFLP ذکرشده مثبت شد و تعیین گونه گردیدند. در تحقیق مشابهی در سال ۲۰۰۶ توسط Al-Jawabreh و همکاران بر روی افراد مشکوک به لیشمانيوز جلدی در کشور مستقل فلسطین، روش PCR ذکرشده، در مورد ۸۲٪ نمونه های منفی، قادر به تشخیص انگل لیشمانيا بوده است (۱۵). ذکر این نکته نیز ضروری است که در مطالعات مختلف انجام گرفته، حساسیت روش مشاهده مستقیم میکروسکوپی در مورد نمونه های مختلف کلینیکی، بین ۴۲٪ تا ۷۶٪ ذکر گردیده است (۱۶، ۱۷) که در این بین، نمونه های تهیه شده از ضایعات جلدی بیماران، کمترین حساسیت را دارند. برخی محققین علت این امر را پراکندگی ناهمگن اماستیگوت های انگل در نمونه های پوستی می دانند که باعث می شود در موارد متعدد، انگل گزارش نشود (۱۵). دلایل دیگری را نیز می توان در مورد تفاوت نتیجه مشاهده میکروسکوپی و PCR بر شمرد، از جمله: خوب رنگ آمیزی نشدن نمونه ها و نیز شایع بودن میزان خود درمانی در بیماران مبتلا به ضایعات جلدی که در مورد مبتلایان به لیشمانيوز، این درمان های غیر اختصاصی، می تواند

## بحث

مطالعه حاضر با هدف تعیین هویت انگل های عامل ایجاد لیشمانيوز جلدی در شهرستان بیرجند انجام گردید. کاربرد روش PCR-RFLP با استفاده از قطعه ITS1 از DNA ریبوزومی انگل، قادر به تعیین گونه انگل در تمامی نمونه های آزمایشگاهی بود و نیز در ۱۳ نمونه از ۳۰ اسپیر میکروسکوپی افراد مشکوک به لیشمانيوز نیز گونه انگل های عامل بیماری را مشخص نمود.

در سال ۲۰۰۷ Kumar و همکاران با کاربرد این روش توانسته بودند، ۷۵٪ انگل های موجود در نمونه های کلینیکی بیماران را تعیین گونه نمایند (۱۳)؛ اما استفاده از این روش توسط El-Beshbishi و همکاران، در تعیین گونه انگل های جداد شده از ضایعات جلدی بیماران مبتلا به لیشمانيوز جلدی در عربستان، تنها ۷۰/۱٪ توانسته است مؤثر باشد (۱۴).

اختلاف بین نتایج تحقیق حاضر با مطالعات ذکرشده، می تواند ناشی از تفاوت بین نمونه های کلینیکی، نحوه استخراج DNA و شرایط انجام PCR باشد.

در عین حال، در تحقیق حاضر از مجموع ۳۰ نمونه

و نیز فرم آنتروپونوتیک سالک ناشی از لیشمانیاتروپیکا در منطقه میباشند؛ همچنین با توجه به عدم مشاهده تفاوت معنی دار از نظر درصد آلودگی به دو گونه انگل در شهر و روستا، به نظر میرسد شرایط لازم برای چرخه زئونوز و نیز انسانی بیماری در هر دو منطقه وجود دارد.

سبب متلاشی شدن و تغییر شکل دادن انگل در بافت شده و تشخیص مورفولوژیک آن را با اشکال مواجه سازد.

در مطالعات دیگری که با استفاده از پرایمرهای بکار گرفته شده در این تحقیق انجام شد نیز حساسیت این روش PCR، بیشتر از روش میکروسکوپی برآورد گردیده است (۱۸)، (۱۹).

### نتیجه‌گیری

استفاده از روش‌های PCR، در تعیین هویت انگل‌های عامل لیشمانیوز جلدی در این تحقیق موفقیت‌آمیز بوده و با کاربرد نمونه‌های تهیه شده طی چند سال گذشته، روشی عملی برآورد می‌گردد. نتیجه تحقیق، حاکی از موجود بودن هر دو فرم لیشمانیوز جلدی آنتروپونوتیک و زئونوتیک در منطقه بیرجند می‌باشد؛ لذا لازم است برای تعیین فون پشه‌خاکی‌های ناقل، میزبانان مخزن جانوری و طرح‌ریزی سیاست‌های کنترل و پیشگیری از بیماری، مطالعات بیشتری صورت گیرد.

### تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی بیرجند با کد ۶۸۳ است. بدین‌وسیله از همکاری مسؤولین محترم مرکز پهداشت شهرستان بیرجند و معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه جانب آقای دکتر زربان، کمال تشکر را داریم.

در تحقیق حاضر، با توجه به هم‌خوانی نتایج DNA sequencing با PCR-RFLP و نیز ایجاد الگوی باندی مربوط به لیشمانیا در مورد تمام نمونه‌ها، به نظر می‌رسد که PCR انجام شده، اختصاصی عمل کرده و احتمال پاسخ مثبت کاذب در آن بسیار کم می‌باشد. گرچه روش PCR انجام شده در مورد KDNA، حساسیت به مراتب کمتری نسبت به روش PCR دیگر داشت، اما با توجه به تک مرحله‌ای بودن و سهولت کاربرد، می‌تواند برای تعیین گونه سریع انگل‌های لیشمانیا به کار رود.

بررسی همه‌گیری عوامل ایجاد بیماری در منطقه، نشان می‌دهد که زمان تقریبی آلودگی به انگل در بیماران مبتلا به لیشمانیا مازور، محدود به ماه‌های مرداد تا مهر؛ یعنی اواسط تابستان تا اوایل پاییز است که احتمالاً هماهنگ با دوره فراوانی جوندگان مخزن بیماری در منطقه می‌باشد؛ در حالی که در مورد بیماران مبتلا به لیشمانیاتروپیکا، در بیشتر ماه‌های سال انتقال بیماری مشاهده می‌گردد. این نتایج، در واقع تأییدکننده چرخه زئونوز بیماری ناشی از لیشمانیا مازور

### منابع:

- 1- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012; 7(5): e35671.
- 2- Mirzaei A, Rouhani S, Taherkhani H, Farahmand M, Kazemi B, Hedayati M, et al. Isolation and detection of Leishmania species among naturally infected Rhombomis opimus, a reservoir host of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Turkmen Sahara, North East of Iran. *Exp Parasitol*. 2011; 129(4): 375-80
- 3- Alborzi A, Pouladfar GR, Fakhar M, Motazedian MH, Hatam GR, Kadivar MR. Isolation of Leishmania tropica from a patient with visceral leishmaniasis and disseminated cutaneous leishmaniasis, southern Iran. *Am J Trop Med Hyg*. 2008; 79(3): 435-7.
- 4- Karamian M, Motazedian MH, Mehrabani D, Gholami K. Leishmania major infection in a patient with visceral leishmaniasis: treatment with Amphotericin B. *Parasitol Res*. 2007; 101(5): 1431-4.

- 5- Hatam GR, Hosseini SM, Ardehali S. Dermotropic isolates of *Leishmania infantum* in Iran. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1997; 91(4): 440.
- 6- Goto H, Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010; 8(4): 419-33.
- 7- Schönian G, Kuhls K, Mauricio IL. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. *Parasitology.* 2011; 138(4): 405-25.
- 8- Motazedian H, Karamian M, Noyes HA, Ardehali S. DNA extraction and amplification of leishmania from archived, Giemsa-stained slides, for the diagnosis of cutaneous Leishmaniasis by PCR. *Ann Trop Med Parasitol.* 2002; 96(1): 31-4.
- 9- Rocha MN, Margonari C, Presot IM, Soares RP. Evaluation of 4 polymerase chain reaction protocols for cultured *Leishmania* spp. typing. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010; 68(4): 401-9.
- 10- Karamian M, Motazedian MH, Fakhar M, Pakshir K, Jowkar F, Rezanezhad H. Atypical presentation of Old-World cutaneous leishmaniasis, diagnosis and species identification by PCR. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2008; 22(8): 958-62.
- 11- el Tai NO, Osman OF, el Fari M, Presber W, Schönian G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000; 94(5): 575-9.
- 12- Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003; 47(1): 349-358.
- 13- Kumar R, Bumb RA, Ansari NA, Mehta RD, Salotra P. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in Bikaner, India: parasite identification and characterization using molecular and immunologic tools. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 76(5): 896-901.
- 14- El-Beshbishi HA, Al-Ali KH, El-Badry AA. Molecular characterization of cutaneous leishmaniasis in Al-Madinah Al-Munawarah province, western Saudi Arabia. *Int J Infect Dis.* 2013; 17(5): e334-8.
- 15- Al-Jawabreh A, Schoenian G, Hamarsheh O, Presber W. Clinical diagnosis of cutaneous leishmaniasis: a comparison study between standardized graded direct microscopy and ITS1-PCR of Giemsa-stained smears. *Acta Trop.* 2006; 99(1): 55-61.
- 16- Aviles H, Belli A, Armijos R, Monroy FP, Harris E. PCR detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. *J Parasitol.* 1999; 85(2): 181-7.
- 17- Andresen K, Gaafar A, El-Hassan AM, Ismail A, Dafalla M, Theander TG, et al. Evaluation of the polymerase chain reaction in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*: a comparison with direct microscopy of smears and sections from lesions. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1996; 90(2): 133-5.
- 18- Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(4): 1435-9.
- 19- Dweik A, Schönian G, Mosleh IM, Karanis P. Evaluation of PCR-RFLP (based on ITS-1 and HaeIII) for the detection of *Leishmania* species, using Greek canine isolates and Jordanian clinical material. *Ann Trop Med Parasitol.* 2007; 101(5): 399-407.

## Molecular identification of cutaneous leishmaniasis agents in Birjand, Iran

**Mehdi Karamian<sup>1</sup>, Mohammad Sedigh Faroghi Bojd<sup>1</sup>, Mina Hemmati<sup>2</sup>, Seyed Alireza Sadatjoo<sup>3</sup>, Darvish Ali Barati<sup>4</sup>**

**Background and Aim:** Cutaneous leishmaniasis (CL) is an endemic disease in different areas of Iran. During past years, the disease was sporadic in Birjand. But, it seems that during recent five years a stable focal leishmaniasis has been developed in the area.

The present study was designed to determine the species of Leishmania parasites in cutaneous lesions of patients residing in the city of Birjand.

**Materials and Methods:** In this cross-sectional study, 80 samples of microscopically-positive slides of cutaneous lesions, belonging to suspected CL patients during the past five years, were examined. The variable kinetoplasmic regions of the DNA of leishmania and ribosomal Internal Transcribed Subunit 1 (ITS1) of the parasite were multiplied by means of PCR procedure .Then, All PCR products of ITS1 were digested with HaeIII for species identification.

**Results:** PCR-RFLP profile of ITS1 rDNA was able to identify species of leishmania in all 80 microscopically-positive (100%) slides and 13 out of 30 (43.3%) microscopically-negative ones. But only 46 samples (57.5%) were identified by means of KDNA PCR. Among the the all subjects, 8 patients (10%) had *leishmania major* and 72 (90%)had been infected with *leishmania tropica*.

**Conclusion:** PCR-RFLP of ITS1 rDNA of leishmania is recommended to diagnose infection with CL agents, because of its high sensitivity.

**Key Words:** Leishmania tropica, Leishmania major, PCR, Birjand, Cutaneous lesion slides

*Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2013; 20 (2): 183-190.*

*Received: March 13, 2013 Accepted: July 3, 2013*

<sup>1</sup> Corresponding author, assistant professor of parasitology, Hepatitis Research Center ,Faculty of Medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran karamianm@yahoo.com

<sup>2</sup> M.D. The city health center of Birjand, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran.

<sup>3</sup> Assistant professor of Biochemistry, faculty of medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran.

<sup>4</sup> Academic member of Faculty of Nursing and Midwifery, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran.

<sup>5</sup> B.S. in Laboratory Sciences, The city health center of Birjand, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran.