Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 12:58 +0430 on Thursday June 21st 2018

Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2012; 15(65): 1-10

Identification of Leishmania species in patients and reservoir rodents using PCR–RFLP in the central county of Qom province in 2010

Saghafipour A(M.Sc)[1]*, Rassi Y(PhD)[2], Abai MR(M.Sc)[2], Oshaghi MA(PhD)[2], Yaghoobi-Ershadi MR(PhD)[2], Mohebali M(PhD)[3], Hajaran H(PhD)[3], Mostafavi R(M.D)[1]

1- Qom Health Center, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran
2- Department of Medical Entomology and Vector Control, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- Department of Parasitology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received:, Accepted:

Abstract

Background: Cutaneous leishmaniasis is a health problem in many areas of Iran. Cutaneous leishmaniasisis reported mostly in the central county of Qom province, including Ghanavat and Qomrood villages. This study was done to identify parasite species in human and rodents in order to illustrate the epidemiologic picture of the disease and provide an appropriate control program in 2010

Materials and Methods: This cross-sectional study was done on microscopic smears of 45 human samples and rodents samples hunted around Ghanavat and Qomrood villages in the central county of Qom province in 2010.In total,15 human samples and one hunted rodent sample were positive. In this study,the DNA of the parasites were extracted from the slides and analyzed by Leishmania specific premiers using ITS1 PCR-amplification (Internal Transcribed Spacer1). PCR (PolymeraseChain Reaction) products were digested by Haelll enzyme.

Results: Overall, 15 human samples and one rodent sample from *Merioneslibycus* species were evaluated by PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). After electrophoresis, it was demonstrated that the parasite was Leishmaniamajor in both human and rodent species.

Conclusion: PCR-RFLP technique is an effective method to determine Leishmania parasite species in Geimsa stained slides from human and rodent reservoirs. One of the advantages of this technique is that it is possible to recognize the pathogen species of Leishmania parasite without gene sequencing. Besides, PCR-RFLP technique is a method of quite high sensitivity and specificity which can identify parasite species in addition to the diagnosis of leishmaniasis within 24 hours.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis, Leishmania, PCR-RFLP

*Corresponding author:
Address: Qom Health Center, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran
Email: Abed.saghafi@yahoo.com

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 12:58 +0430 on Thursday June 21st 2018

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 15، شماره 6 (شماره پیاپی 65)، آبان 1391، 10-1

تعیین هویت انگل لیشمانیا با استفاده از تکنیک *PCR-RFLP* در بیماران و جوندگان مخزن لیشمانیوز جلدی در بخش مرکزی استان قم سال1389

عابدین ثقفی پور[1*]، یاور راثی[2] ، محمد رضا عبایی[3] ، محمدعلی عشاقی[2]، محمدرضا یعقوبی ارشادی[2]، مهدی محبعلی[4]، هما حجاران[5]، رضا مصطفوی[6]

1- کارشناس ارشد حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، مرکز بهداشت استان، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم ، ایران
2- استاد، دکترای حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، گروه حشره شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
3- مربی، کارشناس ارشد حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، گروه حشره شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
4- استاد، دکترای انگل شناسی، گروه انگل شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
5- استادیار، دکترای انگل شناسی، گروه انگل شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
6-پزشک عمومی، مرکز بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران

تاریخ دریافت: 90/5/5 تاریخ پذیرش: 90/9/23

چکیده

زمینه و هدف: لیشمانیوز جلدی یک معضل مهم بهداشتی در بسیاری از مناطق ایران به شمار می‌رود. این بیماری به طور عمده در استان قم از بخش مرکزی شامل دهستان‌های قنوات و قمرود گزارش می‌شود. این مطالعه با هدف تعیین هویت نوع انگل در انسان و جوندگان به منظور شناسایی سیمای اپیدمیولوژیک بیماری و ارائه برنامه کنترل در سال 1389 انجام شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی، گسترش میکروسکوپی 45 نمونه انسانی و 30 نمونه جونده صید شده از مجاورت روستاهای انتخابی از دهستان‌های قمرود و قنوات واقع در بخش مرکزی استان قم مورد آزمایش قرار گرفت که 15 مورد انسانی و 1 مورد جونده اسمیر مثبت داشتند. سپس DNA انگل از روی لام‌ها، استخراج و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی لیشمانیا جهت تکثیر قطعه ITS1 با روش PCR آزمایش شدند و محصولات PCR تحت هضم آنزیمی (HaeIII) قرار گرفت.

یافته‌ها: در مجموع 15 نمونه انسانی و 1 نمونه از جونده گونه مریونس لیبیکوس، مورد آزمایش PCR-RFLP قرار گرفتند. پس از الکتروفورز محصولات واکنش مشخص گردید که انگل موجود در لام‌های انسانی و جونده مریونس لیبیکوس، لیشمانیا ماژور (عامل بیماری لیشمانیوز جلدی روستایی) می‌باشد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به دست آمده روش مولکولی PCR-RFLP روشی مناسب جهت تعیین گونه انگل لیشمانیا در لام‌های رنگ آمیزی شده با گیمسا که از انسان و مخزن حیوانی گرفته شده، می‌باشد و از مزایای این روش این است که بدون انجام تعیین توالی ژن‌ها، تشخیص گونه‌های انگل لیشمانیای مولد بیماری امکان پذیر خواهد بود. ضمن این که تکنیک PCR-RFLP روشی با حساسیت و ویژگی بالا بوده و می‌تواند در طی 24 ساعت علاوه بر تشخیص لیشمانیوز، نوع گونه انگل را تعیین هویت نماید.

واژگان کلیدی: سالک، لیشمانیا، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

* **نویسنده مسئول:** قم دانشگاه علوم پزشکی قم، مرکز بهداشت استان قم

Email: abed.saghafi@yahoo.com

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 12:58 +0430 on Thursday June 21st 2018

مقدمه

لیشمانیوزها (*Leishmaniasis*) که در شمار بیماری‌های مشترک انسان و حیوان‌اند، در اغلب نقاط جهان وجود دارند و به صورت ضایعات پوستی (سالک)، احشایی (کالاآزار) و یا مخاطی - پوستی بروز می‌کنند. عامل بیماری‌زای لیشمانیوز، نوعی تک یاخته به نام لیشمانیا (*Leishmania*) است که برحسب محیط زندگی خود به دو شکل بی تاژک (آماستیگوت یا جسم لیشمن) و تاژک دار (پروماستیگوت) دیده می‌شود. این انگل در مهره‌داران در درون سلول‌های بیگانه خوار تک هسته‌ای زندگی می‌کند و تکثیر می‌یابد(1، 2). سازمان بهداشت جهانی (World Health Organization-WHO) لیشمانیوزها را یکی از 10 بیماری مهم انگلی مناطق گرمسیری دنیا معرفی می‌کند(3، 4).

به علت اهمیتی که این بیماری از نظر بهداشتی دارد، در طول زمان مورد توجه سازمان جهانی بهداشت بوده است. به طوری که در سال‌های اخیر، بخش تحقیقات بیماری‌های گرمسیری این بیماری را در گروه I بیماری‌های نوپدید و کنترل نشده قرار داده است. در حال حاضر 88 کشور جهان در قاره‌های آسیا، اروپا، آفریقا و آمریکا به انواع مختلف بیماری آلوده می‌باشند. میزان شیوع آن 14-12 میلیون مورد و میزان بروز سالیانه آن 2-1/5 میلیون گزارش شده است که 500 هزار مورد مربوط به لیشمانیوز احشایی و بقیه مربوط به لیشمانیوز جلدی است. سالیانه 90 درصد از موارد لیشمانیوز جلدی از کشورهای افغانستان، برزیل، ایران، پرو، عربستان سعودی، سوریه، الجزایر و سودان و 90 درصد موارد لیشمانیوز جلدی- مخاطی از کشورهای بولیوی، برزیل و پرو گزارش می‌شود(1، 5).

لیشمانیوز جلدی روستایی از معضلات مهم بهداشتی ایران است به طوری که در بسیاری از مناطق روستایی 17 استان از 30 استان کشور شایع است. استان اصفهان و منطقه ترکمن صحرا از جمله مهم‌ترین کانون‌های بیماری لیشمانیوز جلدی روستایی در ایران هستند(1، 6، 7).

بر اساس گزارش‌های مرکز مدیریت بیماری‌ها، تعداد مبتلایان به انواع مختلف لیشمانیوزها در کشور سالیانه 20000 نفر می‌باشد، ولی بدون شک ارقام واقعی بیماری 4 تا 5 مرتبه بیشتر از ارقام ثبت شده است. گسترش سریع شهرها، احداث اماکن مسکونی بر روی کلونی جوندگان، تغییرات محیط زیست بر اثر حرکات جمعیت، سدسازی، قطع برنامه‌های سم پاشی بر علیه ناقلین مالاریا در بسیاری از مناطق، ورود و خروج افاغنه و بالاخره مشکلات ناشی از افزایش سریع جمعیت و به طور کلی تغییرات اجتماعی اقتصادی سبب شده است که امروزه لیشمانیوز به عنوان یک مشکل بهداشتی مهم در کشور مطرح باشد(10-8).

لیشمانیوز جلدی در ایران به دو شکل لیشمانیوز جلدی روستایی یا مرطوب و لیشمانیوز جلدی شهری یا خشک دیده می‌شود(2). در نوع روستایی که با عامل لیشمانیا ماژور به وجود می‌آید جوندگان نقش مخزن بیماری را ایفا می‌کنند و ناقل اصلی بیماری نیز پشه خاکی گونه فلبوتوموس پاپاتاسی است اما در نوع شهری عامل بیماری لیشمانیا تروپیکا، مخزن اصلی انسان و ناقل اصلی فلبوتوموس سرژانتی است(13-11).

اصولاً تعیین گونه و حتی سویه لیشمانیا جهت انجام مطالعات همه‌گیری شناختی به منظور تعیین ناقل اصلی، مخزن قطعی و عفونت انسانی و رابطه آنها با یکدیگر، تهیه و ارزیابی انواع واکسن‌های تهیه شده علیه لیشمانیوزها، تعیین اثر درمانی روش‌های گوناگون و انتخاب استراتژی مناسب جهت کنترل و پیش‌گیری لیشمانیوزها لازم و ضروری است(2).

هر نوع مطالعه علمی بر روی لیشمانیوزها بدون در نظر داشتن گونه و در مواردی سویه عامل بیماری‌زا کامل نیست. از آنجا که گونه‌های گوناگون انگل‌های لیشمانیا از نظر ریخت شناسی و با استفاده از میکروسکوپ‌های نوری حتی با بزرگ‌ترین درشت نمایی شباهت زیادی به یکدیگر داشته و تفکیک ناپذیرند، لذا جهت تفکیک و تقسیم این انگل‌ها از روش‌های مختلفی از جمله روش‌های مولکولی استفاده می‌کنند(2).

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 12:58 +0430 on Thursday June 21st 2018

روش‌های مولکولی در تشخیص بیماری لیشمانیوز و شناسایی گونه‌های انگل در سال‌های اخیر رواج یافته‌اند. از مزایای این روش‌ها حساسیت و اختصاصیت بسیار بالای آن‌ها می‌باشد. لذا می‌توان با استخراج DNA از لام‌های رنگ آمیزی شده با گیمسا و انجام واکنش‌های زنجیره‌ای پلی مرازی (PCR) انگل را تعیین هویت نمود(15، 14).

جهت مطالعات مولکولی قسمت‌های مختلف ژنوم انگل لیشمانیا استفاده می‌شود(15، 16). یکی از قسمت‌های ژنوم که کاربرد زیادی دارد مربوط به ژن ریبوزوم (rDNA) می‌باشد که جهت تکثیر قطعه Internal ITS1 (Transcribed Spacer1 استفاده می‌گردد. در این روش به علت یکسان بودن طول محصول PCR قطعات ITS1 برای گونه‌های لیشمانیاهای بیماری‌زای انسانی لازم است با تعیین توالی و یا روش PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ، انگل تعیین هویت شود(19-17).

این مطالعه به منظور تعیین هویت انگل لیشمانیا با استفاده از تکنیک PCR-RFLP در لام‌های رنگ آمیزی شده مربوط به بیماران و جوندگان مخزن لیشمانیوز جلدی در روستاهای منتخب از بخش مرکزی استان قم در سال 1389 صورت گرفته است.

مواد و روش ها

این مطالعه مقطعی بر روی لام‌های رنگ آمیزی شده مربوط به زخم‌های انسانی و هم‌چنین اسمیرهای تهیه شده از جونده مریونس لیبیکوس که آلوده به انگل لیشمانیا بوده‌اند در طول سال 1389 در روستاهای انتخابی از دهستان‌های قمرود و قنوات واقع در بخش مرکزی استان قم انجام گرفت. با توجه به آمار مرکز بهداشت استان قم در خصوص بالا بودن میزان بروز لیشمانیوز جلدی در بخش مرکزی استان؛ این پژوهش در پنج روستای کوه سفید، فرج‌آباد، حسین آباد میش مست، جنت آباد و جعفرآباد مسیله انجام گرفت. در این منطقه هوا در طول تابستان گرم بوده (حدود 48 درجه سانتی‌گراد) و در زمستان سرد می‌باشد. اغلب مردم در روستاهای این بخش از استان به شغل دامپروری و کشاورزی مشغول هستند.

لام‌های انسانی از بیماران مشکوک به سالک که به مراکز بهداشتی درمانی مراجعه کرده بودند گرفته شد. جوندگان نیز از کلونی‌های مجاور روستاهایی که کانون بیماری سالک بودند صید شدند. صید جوندگان با استفاده از تله‌های زنده گیر صورت گرفت. هر ماه دوبار و در هر دفعه 30 عدد تله زنده‌گیر در نزدیکی لانه‌های فعال جوندگان کار گذاشته شد. در این تله‌ها از خیار، گوجه، سوسیس، گردوی بوداده و هویج به عنوان طعمه استفاده گردید. تله‌ها معمولاً از غروب آفتاب نصب شده و تا روز بعد قبل از گرم شدن هوا جمع‌آوری می‌شدند. جوندگان صید شده جهت تهیه اسمیر به آزمایشگاه دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران انتقال داده شدند و از لاله گوش و یا زخم‌های مشکوک روی پوست گسترش تهیه و پس از رنگ آمیزی با گیمسا زیر میکروسکوپ نوری برای وجود اجسام لیشمن مورد بررسی قرار گرفتند. برای شناسایی جوندگان از کلید اعتماد استفاده شد(20). لام‌ها از نظر آلودگی به اجسام لیشمن مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفتند، سپس این لام‌ها با چاقو تراشیده شدند و بر روی محتویات تراشیده شده از لام‌ها، برای انجام مطالعات مولکولی طبق پروتکل مربوطه، مراحل استخراج DNA (با استفاده از کیت مخصوص استخراج DNA از بافت شرکت سیناژن، ایران) انجام شد.

بر روی نمونه های مثبت جهت تعیین هویت انگل، آزمایش PCR صورت گرفت. برنامه زمانی آزمایش PCR به این ترتیب بود که مرحله واسرشت اولیه در 95 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه، مرحله واسرشت در 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه، مرحله اتصال به مدت 30 ثانیه در 48 درجه سانتی‌گراد، مرحله باز آرایی به مدت یک دقیقه در 72 درجه سانتی‌گراد و مرحله بازآرایی نهایی به مدت 7 دقیقه در 72 درجه سانتی‌گراد صورت پذیرفت.

پرایمرهای به کار رفته در این مطالعه شامل LITSR:5`CTGGATCATTTTCCGATG3`

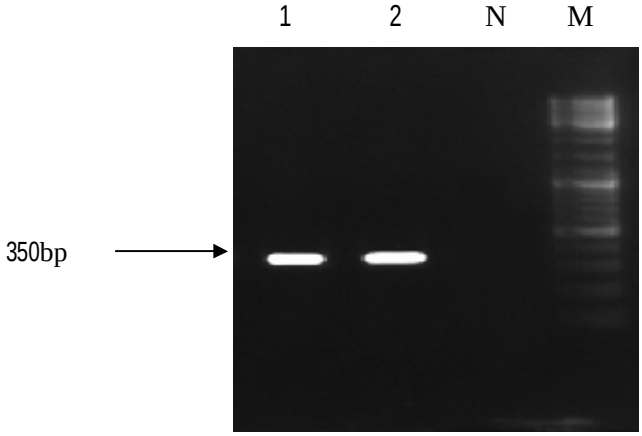
Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 12:58 +0430 on Thursday June 21st 2018

L5.8S:5`TGATACCACTTATCGCAC TT3` بودند که قطعه ITS1 را در تمام گونه‌های لیشمانیا تکثیر می‌کنند. محصول بر روی ژل آگاروز یک درصد حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز شد. از آنجایی که با تکثیر ناحیه ITS1 باند ایجاد شده برای تمام گونه‌های انگل لیشمانیا بین 50-300 bp می‌باشد، افتراق گونه‌ها غیر ممکن خواهد بود لذا برای تعیین گونه انگل لیشمانیا از آنزیم محدود کننده HaeIII (معرفی شده توسط Dweik) جهت انجام واکنشRFLP استفاده شد که توالی ITS1 را در قسمت GG↓CC قطع می‌کند و در انگل‌های لیشمانیا با توجه به تعداد نقطه برش محل‌های مختلفی قطع خواهند شد که پس از الکتروفورز، محصول به صورت باندهای جداگانه بر روی ژل قابل رویت می‌باشد و می‌توان گونه‌های انگل را از روی این طول باندها از یکدیگر تمیز داد. برای انجام این واکنش به ازای هر 20 میکرولیتر از حجم واکنش، مواد زیر به نسبت باهم مخلوط شدند: 15 میکرولیتر محصول PCR، 2 میکرولیتر بافر مخصوص آنزیم، 1/5 میکرولیتر آنزیم محدود کننده HaeIII و 1/5 میکرولیتر آب مقطر(21).

پس از تهیه مخلوط اصلی آن را به مدت کوتاهی (حدود 5 ثانیه) با سرعت 8000 دور سانتریفیوژ کرده و سپس یک قطره روغن معدنی (20 میکرولیتر) به آن اضافه گردید تا از تبخیر اجزای واکنش در انکوباتور جلوگیری شود. نمونه‌های آماده شده به مدت 8 ساعت در انکوباتور 37 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از اتمام این زمان، 10- 5 میکرولیتر از محصول PCR–RFLP در کنار مارکر ژنتیکی 100bp (محصول شرکت سینا ژن، ایران) در ژل 2 درصد الکتروفورز گردید.

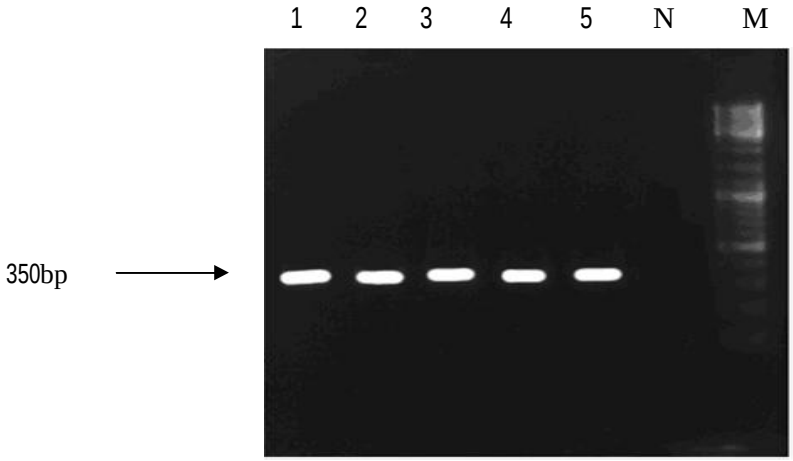
یافته ها

در این مطالعه اسمیر میکروسکوپی 45 نمونه انسانی و 30 نمونه از جونده مورد بررسی قرار گرفت که 15 مورد انسانی و 1 مورد جونده اسمیر مثبت داشتند. این نمونه‌های مثبت برای تعیین هویت انگل، مورد آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز قرار گرفتند، پس از انجام الکتروفورز مشخص گردید که باندهای ایجاد شده در محدوده 350 bp می‌باشند(شکل 1 و 2)



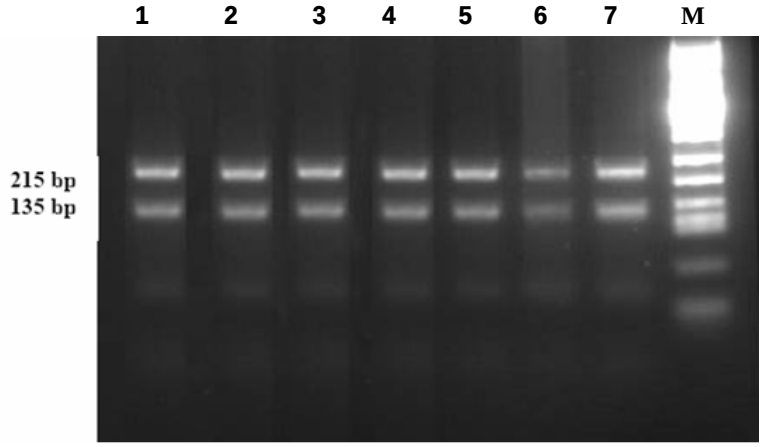
شکل1. نتایج باندهای حاصل از تکثیر DNA انگل انگل لیشمانیا ماژور با پرایمرهایITS1 (باند 1: نمونه موش مریونس لیبیکوس آلوده، باند 2 : لیشمانیا ماژور استاندارد، N: کنترل منفی ، M: مارکر)

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 12:58 +0430 on Thursday June 21st 2018



شکل 2. نتایج باندهای حاصل از تکثیر DNA انگل *لیشمانیا ماژور* با پرایمرهای ITS1 (باندهای های 1-4 : نمونه‌های گرفته شده از زخم‌های افراد آلوده، باند 5 : لیشمانیا ماژور استاندارد، N: کنترل منفی ، M: مارکر)

پس از RFLP و انجام الکتروفورز مشخص گردید که باندهای ایجاد شده در نمونه‌های انسانی و نمونه‌های جونده مشابه باندهای لیشمانیا ماژور استاندارد می‌باشند که به صورت دو باند 215 bp و 135 bp مشاهده شدند (شکل 3)



شکل 3. الکتروفورز محصول PCR- RFLP ژن ITS1(باندهای های 1-4 : نمونه های گرفته شده از زخم های افراد آلوده ، باند 5 -6: موش های مریونس لیبیکوس آلوده ، 7 : لیشمانیا ماژور استاندارد، M: مارکر)

بحث

بررسی و شناسایی ابعاد اپیدمیولوژیک بیماری لیشمانیوز جلدی اعم از پشه خاکی‌ها، جوندگان و عفونت انسانی جهت اتخاذ روش‌های مبارزه با بیماری و ارائه راهکارهای کنترل و پیش‌گیری ضروری است. در این راستا تعیین هویت انگل در بیماران و جوندگان از اهمیت بالایی برخوردار است زیرا که نوع بیماری را مشخص خواهد کرد(22).

تشخیص دقیق گونه انگل‌های لیشمانیا با مشاهده میکروسکوپی لام‌های رنگ آمیزی شده با گیمسا امکان‌پذیر نیست و برای تشخیص گونه نیاز به جداسازی انگل، کشت آن و تزریق به حیوان حساس آزمایشگاهی و یا استفاده از روش ایزوآنزیم می‌باشد که انجام آنها وقت گیر و پرهزینه

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 12:58 +0430 on Thursday June 21st 2018

بوده و مستلزم تکثیر انگل به تعداد زیاد می‌باشد(23). روش‌های متکی بر DNA از جمله PCR که جهت تشخیص بیماری لیشمانیوز در سال‌های اخیر بسیار از آن استفاده می‌شود، محدودیت‌های فوق را نداشته و با مقدار کمی از DNA بافت آلوده می‌توان وجود آلودگی را تشخیص داد(15، 17، 23). این مطالعه یک بررسی جهت تعیین هویت انگل لیشمانیا در انسان و جوندگان مخزن بیماری لیشمانیوز در بخش مرکزی استان قم بوده است که در این بررسی ابتدا برای نمونه‌های مطالعه و نمونه‌های استاندارد به منظور تکثیر ناحیه ITS1 واکنش‌های زنجیره‌ای پلی مرازی (PCR) انجام شد. پس از رویت باندهای ایجاد شده مشخص گردید که برای نمونه‌های مطالعه حاضر و نمونه استاندارد که از گونه‌های مختلفی بودند باندهایی در محدوده 350 bp تشکیل شده است که جهت تعیین گونه کمکی نکرده است. لذا از روش RFLP جهت تمایز گونه‌ها استفاده شد که نشان داد روش بسیار خوبی جهت تشخیص گونه‌های لیشمانیای ایجاد کننده بیماری در ایران است، به طوری که با مشاهده پلی مورفیسم ایجاد شده در اثر هضم آنزیمی که برای هر گونه اختصاصی است می‌توان به نوع انگل پی برد. پس از الکتروفورز محصولات واکنش RFLP مشخص شد که باندهای ایجاد شده برای نمونه‌های انسانی و جونده مشابه هم بوده و برای آنها دو باند در محدوده 220 bp و 140 bp مشاهده شده که مطابق با باندهای ایجاد شده برای انگل لیشمانیا ماژور استاندارد بوده است. بنابر این می‌توان نتیجه‌گیری کرد که انگل لیشمانیا ماژور در لام‌های رنگ آمیزی شده با گیمسا حضور داشته است. به عبارتی افراد بیمار و جونده مریونس لیبیکوس به این انگل آلوده بوده‌اند. این انگل عامل لیشمانیوز جلدی نوع روستایی است و در بسیاری از کانون‌های لیشمانیوز ایران انتشار دارد(6، 11، 24).

در مطالعه انجام شده بر روی بیماران مبتلا به لیشمانیوز در بم و شیراز به منظور تشخیص و تعیین ژنوتایپ گونه‌های لیشمانیا جلدی با تکنیک آنالیز هضم آنزیمی (RFLP) مشخص گردید که همه 83 نمونه، مثبت بوده و گونه انگل، لیشمانیا تروپیکا می‌باشد که با نتایج اسمیرهای میکروسکوپی مثبت نیز مطابقت داشت(25) هم‌چنین ظرف مدت 24 ساعت نتایج این روش قابل بهره‌برداری است.

در پژوهشی دیگری در مشهد، 34 درصد نمونه‌ها لیشمانیا ماژور بودند و باند حاصل از آنها 127 bp بود که تقریباً مشابه باند حاصل از نمونه‌های انسانی و حیوان کانون آندمیک بیماری لیشمانیوز جلدی در بخش مرکزی قم می‌باشد. در ضمن 66 درصد نمونه‌ها لیشمانیا تروپیکا بودند و باند آنها در حدود 225 bp و 178 بود(26) که تفاوت زیادی با نمونه‌های قم دارد. این مطلب حساسیت بالای این روش در تشخیص گونه‌های مختلف لیشمانیا را تایید می‌کند.

در مقایسه با مطالعه‌ای که اردهالی و همکاران با آنتی‌بادی‌های منوکلونال داشتند، نمونه‌ای در این مطالعه یافت نشد که به وسیله تکنیک RFLP-PCR قابل تشخیص نباشد در حالی که در روش آنتی بادی منوکلونال توسط اردهالی و همکاران علاوه بر کشت و خالص سازی انگل لیشمانیا که وقت گیر است، برخی از سویه‌ها با آنتی بادی منوکلونال واکنشی نشان ندادند(27). از این روش برای تشخیص آلودگی سگ‌ها به انگل‌های لیشمانیا در کشور برزیل استفاده شده و نتایج مطلوبی به دست آمده است(28). مارفورت در سویس توانست نمونه‌های انگل جدا شده از بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی را با استفاده از روش RFLP-PCR تشخیص دهد، هم‌چنین نشان داد که این تکنیک در مقایسه با روش‌های کشت آزمایشگاهی و سرولوژی از حساسیت بالاتری برخوردار است(29).

بنابراین روش PCR-RFLP می‌تواند روش بسیار مناسبی به منظور تعیین گونه باشد و با استفاده از این روش در وقت و هزینه صرفه‌جویی به عمل می‌آید به طوری که دیگر نیاز به مقدار زیاد محصول PCR و هم‌چنین تعیین توالی نمی‌باشد. در ضمن در وقت و زمان نیز صرفه جویی می‌شود. مخزن بیماری در این مطالعه جونده مریونس لیبیکوس تشخیص داده شد. این گونه به عنوان مخزن بیماری در دیگر کانون‌ها نظیر بادرود، مرودشت، ارسنجان،

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 12:58 +0430 on Thursday June 21st 2018

نیریز، خاتم، بافق به عنوان مخزن اصلی گزارش شده است(10، 34-30). حضور جونده مریونس لیبیکوس با وفور بالا در فاصله بسیار نزدیک با روستاها و توسعه فعالیت‌های کشاورزی در منطقه به بومی شدن بیماری در منطقه کمک کرده است. لذا جهت کاهش بروز بیماری کنترل جوندگان همواره می‌بایست مد نظر قرار گیرد.

نتیجه گیری

شناسایی و تعیین هویت انگل لیشمانیا با استفاده از روش مولکولی PCR-RFLP در لام‌های رنگ آمیزی شده با گیمسا در نمونه‌های انسانی، جوندگان و پشه خاکی‌ها روش مناسب و به صرفه‌ای است. از مزایای این روش این است که بدون انجام تعیین توالی ژن‌ها، تشخیص گونه‌های انگل لیشمانیای مولد بیماری امکان پذیر خواهد بود. بنابراین این تکنیک در کنار سایر روش‌ها مثل تزریق انگل به حیوان آزمایشگاهی، کشت انگل و تست‌های سرولوژی مفید خواهد بود. ضمن این که تکنیک PCR-RFLP روشی با حساسیت و ویژگی بالا بوده و می‌تواند در طی 24 ساعت علاوه بر تشخیص لیشمانیوز، نوع گونه انگل را تعیین هویت نماید.

تشکر و قدردانی

این مطالعه در قالب پایان نامه دانشجویی کارشناسی ارشد حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین و طرح مصوب دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران با کد 6168 و همکاری دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی قم انجام شده است. بدین وسیله از زحمات جناب آقای دکتر امیر اکبری، ریاست محترم مرکز بهداشت استان قم به خاطر مساعدت در جمع‌آوری نمونه‌ها و کارکنان آزمایشگاه مولکولی گروه حشره شناسی پزشکی و گروه انگل شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران به جهت فراهم نمودن سوش‌های استاندارد لیشمانیا، تقدیر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Ardahali S, Rezaei H, Nadim A. Leishmania and Leishmaniasis. 2 ed. Tehran: Tehran university publication center; 1994.[persian]
2. Nadim A, Javadian E, Mohebali M, Zamen-moemeni A. Leishmania and Leishmaniasis. 3 ed. Tehran: Tehran university publication center; 2008. [persian]
3. Mohebali M. A review of a new treatment method of cutaneous leishmaniasis in human. Razi Journal. 1995; 12(3): 11-15.[persian]
4. Mohebali M. The Zonotic Protozoan diseases. 2 ed. Tehran: Nadi; 1996.[persian]
5. Javadian E, Yaghoobi – Ershadi MR. The Study on present situation of cutaneous leishmaniasis and it,s reservoir in Iran Tehran: Scientific researches of Tehran university of Medical sciences publication; 1995.[persian]
6. Rassi Y, Sofizadeh A, Abai M, Oshaghi M, Rafizadeh S, Mohebail M, et al. Molecular Detection of Leishmania major in the Vectors and Reservoir Hosts of Cutaneous Leishmaniasis in Kalaleh District, Golestan Province, Iran. Iranian Journal of Arthropod-Borne Diseases. 2008;2(2):21-7.
7. Yaghoobi-Ershadi M, Javadian E. Studies on sandflies in a hyperendemic area of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. The Indian journal of medical research. 1997;105:61-6.
8. Javadian E, Nadim A, Tahvildare-Bidruni G, Assefi V. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Iran: B. Khorassan Part V: Report on a focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Esferayen. Bulletin de la Societe de pathologie exotique et de ses filiales. 1976;69(2):140-1.
9. Seyedi-Rashti M, Salehzadeh A. A new focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis near Tehran, Iran. Bulletin de la societe francaise de parasitologie. 1990;8.
10. Rassi Y, Amin M, Javadian E, Motazedian H, editors. Epidemiological studies on Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis in Neiriz focus, Fars province, South of Iran (2001-2002)2003.
11. Ardahali S, Rezaei H, Nadim A. Leishmania and Leishmaniasis. 2 ed. Tehran: Tehran university publication center; 1994.[persian]

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 12:58 +0430 on Thursday June 21st 2018

12. Rassi Y ,Hanafi bojd AA. Sand fly, the vector of leishmaniasis. Tehran: Noavaran Elm; 2006.[persian]
13. Nadim A, Mesghali A, Seyedi-Rashti M. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Iran B. Khorassan. IV. Distribution of sandflies. Bulletin de la Societe de pathologie exotique et de ses filiales. 1971;64(6):865-70.
14. Singh S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. The Indian journal of medical research. 2006;123(3):311.
15. Baker JR, Alvar J. Molecular tools for epidemiological studies and diagnosis of leishmaniasis and selected other parasitic diseases: Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene; 2002;96:1-250.
16. Banuls AL, Hide M, Prugnolle F. Leishmania and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. Advances in parasitology. 2007;64:1-458.
17. Dweik A, Schönian G, Mosleh I, 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. Annals of tropical medicine and parasitology. 2007;101(5):399-407.
18. El Tai N, Osman O, 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. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2000;94(5):575-9.
19. Marfurt J, Niederwieser I, Makia ND, Beck HP, Felger I. Diagnostic genotyping of Old and New World Leishmania species by PCR-RFLP. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2003;46(2):115-24.
20. Etemad E. Mammals of Iran. Rodents and their Identification Keys Tehran, National Society of Guardianship of Natural Resources and Human Environment. 1978;1.
21. Swaminath C, Shortt H, Anderson L. Transmission of Indian kala-azar to men by the bites of Phlebotomus argentipes. Ann and Brun Indian Journal of Medical Research. 1942; 30: 473-7.
22. Meeting WECotCotL. Control of the leishmaniases: report of a WHO expert committee: World Health Organization; 1990; 18: 793.
23. Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HDFH, Presber W, et al. PCR diagnosis and characterization of Leishmania in local and imported clinical samples. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2003;47(1):349-58.
24. Rassi Y, Javadian E, Amin M, Rafizadeh S, Vatandoost H, Motazedian H. Meriones libycus is the main reservoir of zoonotic cutaneous leishmaniasis in south Islamic Republic of Iran. Eastern Mediterranean Health Journal. 2006; 12(3/4):474-7.
25. Khalili M. Detection and genotyping of cutaneous leishmaniasis species in the southeast of Iran: restriction enzyme analysis (RFLP). Tehran University Medical Journal. 2009; 67(3): 168-72.
26. Vaeznia H, Dalimi A, Sadraei J, Pirstani M. Determination of Leishmania species causing cutaneous leishmaniasis in Mashhad by PCR-RFLP method. Archives of Razi. 2009; 64(1): 39-44.
27. Ardehali S, Moattari A, Hatam G, Hosseini S, Sharifi I. Characterization of Leishmania isolated in Iran: 1. Serotyping with species specific monoclonal antibodies. Acta tropica. 2000;75(3):301-7.
28. de Andrade HM, Reis AB, dos Santos SL, Volpini ÂC, Marques MJ, Romanha AJ. Use of PCR–RFLP to identify Leishmania species in naturally-infected dogs. Veterinary parasitology. 2006;140(3):231-8.
29. Marfurt J, Nasereddin A, Niederwieser I, Jaffe CL, Beck HP, Felger I. Identification and differentiation of Leishmania species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. Journal of clinical microbiology. 2003;41(7):3147-53.
30. Yaghoobi-Ershadi M, Akhavan A, Zahraei-Ramazani A, Javadian E, Motavalli-Emami M. Field trial for the control of zoonotic cutaneous leishmaniosis in Badrood, Iran. Annals of Saudi Medicine. 2000;20(5/6):386-9.

31. Rassi Y, Javadian E, Jalali M, Motazedian M, Vatandoost H. Investigation on zoonotic cutaneous leishmaniasis, Southern Iran. Iranian J Publ Health. 2004;33(1):33-5.
32. Rassi Y, Jalali M, Javadian Ex. Motazedian Mh. Confirmation of Meriones Libycus (Rodentia: Gerbillidue) a the Main Reservoir Host of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis in Arsanjan, Fars Province, South of Iran. (1999-2000). Iranina J Pupl Health. 2001;30(3-4):143-4. [persian]
33. Yaghoobi-Ershadi MR. The epidemiology of cutaneous Leishmaniosis a new focus of Khatam city. Journal of Yazd university of medical sciences.2007; 15(4): 47-52.[Persian]
34. Jafari R, Mohebali M, Dehghan Dehnavi A, Soleimani H, Akhavan A, Hajaran H. The epidemiology of cutaneous Leishmaniosis in Bafgh city Yazd province 2005. Journal of Yazd university of medical sciences.2007; 15(2): 76-83.[Persian]

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 12:58 +0430 on Thursday June 21st 2018