تعیین گونه های مولد لیشمانیوز جلدی ایزوله های مختلف جدا شده از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان رازی، تهران، سال ۱۳۸۹ با استفاده از ژن ITS1 و آنزیم Apo1 با روش ملکولی PCR-RFLP

نسیبه بهشتی[۱]، فاطمه غفاری فر*[۱]، عبدالحسین دلیمی اصل[۱]، زهرا اسلامی راد[۲]، زهره شریفی[۳]، محمد فریور صدری[٤]، پریسا ابراهیمی[۱]

۱) گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

۲) گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک

۳) گروه میکروب شناسی، موسسه عالی و آموزش و پژوهش طب، انتقال خون تهران

٤) گروه آسیب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

تاریخ دریافت:۹۰/٤/۲۲ **تاریخ پذیرش: ۹۱/٤/۱۲**

چکیده

مقدمه: لیشمانیوزیس از بیمـــاری های مهم بومی در ایران است و به دو نوع جلدی و احشایی دیده می شود. از آن جائی که تعیین گونه این انگل در کنترل و پیش گیری بیماری موثر است، لذا این مطالعه با هدف تعیین گونه لیشمانیوز جلدی طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش ها: در این مطالعه از ۳۵ بیمار مبتلا به لیشمانیازیس جلد ۱۸ مورد آلودگی از اصفهان(حاشیه اطراف اصفهان، اردستان، کاشان و سمیرم) ۲ مورد از کرمان(کانون آلودگی سیرجان) ۴ مورد خراسان(۲ مورد مشهد و ۲ مورد اسفراین) ۲ مـــورد بوشهر، ۳ مورد سمـــنان(کانون آلودگی دامغان) و ۱ مورد از قم) پس از انجام تهیه لام مستقیم، نمونه برداری شد. از نمونه ها استخراج DNA انجام و واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) با استفاده ازژن ITS1 انجام شد. برای آزمایش طول قطعه محدودیتی (RFLP) از آنزیم Apo1 استفاده شد.

یافته های پژوهش: نتایج PCR برای همه نمونه ها مثبت و باندهایی با اندازه ۶۹-۳۵۰ جفت باز را نشان داد. نتایج به دست آمده از RFLP نشان داد که از بین نمونه های مورد مطـــالعه ۳۳ نفر(۹۴ درصد) لیـــشمانیا مـــاژور و ۲ نفـــر(۶ درصد) لشیمانیا تروپیکا می باشد. در این مطالعه بیشترین میزان آلودگی در گروه های سنی ۱۹-۱۰ سال و کمترین میزان آلودگی در گروه های سنی بالای ۵۰ سال دیده شد.

بحث و نتیجه گیری: مطالعات نشان می دهد که ژن ITS1 و آنزیم Apo1 ژن و آنزیم مناسب برای تشخیص دو گونه لیشمانیا مـــاژور و لیشمانیا تروپیـــکا از هم می باشد و روش PCR-RFLP یک روش مناسب برای تشخیص گونه های مولد لیشمانیوز جلدی است.

واژه های کلیدی: لیشمانیوز جلدی، تشخیص، ITS1، PCR-RFLP، آنزیم Apo1

* **نویسنده مسئول:** گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

Email: ghaffarifar@yahoo.com

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-11-26]

مقدمه

لیشمانیوزیس، یک مسئله مهم بهداشتی در جهان و از بیماری های بومی در ایران تلقی می شود. این بیماری توسط تک یاخته های نسجی خونی داخل سلولی اجبـــاری از جنس لیشمانیا است، و به وسیله پشه های خاکی ماده انتقال می یابد.(۱)

جنس لیشمانیا در میزبان مهره دار به شکل آماستیگوت که بدون تاژک و درون یاخته ای است و در میزبان بی مهره و محیط کشت به شکل لپتوموناد پروماستیگوت تاژکدار و برون یاخته ای است.(۲)

دست کم با چهار نوع نشانه بالینی متفاوت: لیشمانیوزیس جلدی(سالک)، لیشـــمانیوزیس احشائی، لیشمانیـــوزیس جلدی منتـــــشر و لیشمانیـــــوزیس جلدی-مخاطی بروز می کند.(۲)

تظاهرات بالینی به نوع لیشمانیا، درجه زخم های مزمن در بیماری جلدی و صورت بدشکل در فرم های جلدی-مخاطی به درگیری سیستم رتیکولوآندوتلیال بستگی دارد. شدت تظاهرات سیستمیک هم چنین بستگی به حالات ایمنولوژیک میزبان دارد.(۱)

میزان بروز بیماری همواره در فاصله بین ۲۰ تا ۴۰ مورد در هر صد هزار نفر جمعیت نوسان داشته است به دنبال هر یک یا دو سال کاهش بیماری یک یا دو سال افزایش موارد بیماری وجود داشته که نشان دهنده سیر طبیعی بیماری و تأثیر موقتی اقدامات کنترلی که به صورت مقطعی اعـــمال گردیده است. باید راه حلی ریشه ای برای بهبود وضعیت پیشنهاد و و به وسیله کلیه ارگان های ذیربط به صورت همـــاهنگ عملی گردد،(۴-۳). روش متداول تشخیص لیشمانیوز جلدی در حال حاضر آزمایش میکروسکوپی و مشاهده مستقیم جسم لیشمن می باشد. این روش از حساسیت بالایی برخوردار نیست زیرا در بعضی از موارد تعداد انگل کم می باشد و جواب آزمایش منفی کـــاذب گـــــزارش می شود. از روش کشت انگل لیشمانیا نیز برای تشخیص استفاده می شود که روش حساسی است ولی احتیاج به زمان طولانی برای ارائه نتیجه دارد. استفاده از روش PCR یک روش حساس برای تشخیص است که نتیجه را می توان در زمان کوتاهی گزارش کرد. چـــنان چه از روش PCR-RFLP استفاده کنـــیم می توانیم گونه ایجاد کننده بیماری را نیز تعیین نماییم. در دهه گذشته روش های ملکولی متعددی برای مطالـــعات اپیدمیولوژیک لیشمانیازیس به کار گرفته شده اند. تکنولوژی PCR در این مطالعات روش موفقی بوده که بدون نیاز به کشت می تواند عفونت را حتی در حد گونه تشخیص دهد،(۹-۵). روش PCR-RFLP بیشترین کاربرد را برای تشخیص گونه های لیشمانیا دارد.(۱۴-۱۰)

مواد و روش ها

کشت و نگهداری انگل

در این مطالعه از دو محیط دو فازی NNN تغییر یافته جهت بقاء و محیط تک فازی RPMI1640 غنی شده جهت تکثیر انبوه انگل استفاده شد.

یافتن بیماران با زخم های لیشمانیوزیس جلدی

برای یافتن بیماران با زخم های لیشمانیوزیس جلدی به بیمارستان رازی تهران مراجعه و از بیمارانی که زخم های آن ها از نظر بالینی شبیه به زخم سالک بود و از مناطق مختلف ایران مراجعه کرده بودند علاوه بر پرکردن پرسش نامه نمونه تهیه شد. در این مطالعه از ۳۵ بیمار مبتلا به لیشمانیازیس جلدی،(۱۸ مورد آلودگی از اصفهان حاشیه اطراف اصفهان، اردستان، کاشان و سمیرم)، ۲ مورد از کرمان(کانون آلودگی سیرجان)، ۴ مورد خراسان(۲ مورد مشهد و ۲ مورد اسفراین) ۲ مورد بوشهر، ۳ مورد سمنان(کانون آلودگی دامغان) و ۱ مورد از قم نمونه از زخم تهیه شد. برای نمونه استاندارد نیز از سویه ایرانیMRHO/IR/75/ER کشت داده شده در RPMI و دارای ۱۰ درصد FCS استفاده شد.

تهیه نمونه از زخم بیماران

ابتدا محل نمونه برداری بر اساس طول دوره بیماری و شکل ضایعه تعیین شد و به کمک یک پنبه آغشته به الکل، محل ضد عفونی گردید. سپس تیغه بیستوری را بر روی شعله حرارت داده تا کاملاً سرخ شود و به کمک یک پنبه آغشته به الکل، سرد نموده و با تیغه بیستوری در لبه استریل شده ضایعه کوچکی ایجاد نموده ایم. با خراشیدن(Scraping) این ناحیه، برداشت اول دور ریخته شد و در برداشت نهایی از نسج نمونه تهیه شد.(۱۵)

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-11-26]

در ابتدا شماره بیمار را روی لام نوشته و سپس تیغه بیستوری را روی لام می کشیم تا نمونه برداشته شده روی لام قرار گیرد و بدین ترتیب گسترش تهیه گردید. لام پس از ثابت شدن با الکل متیلیک با گیمسا رنگ آمیزی شد. در زیر میکروسکوپ جسم لیشمن یا آماستیگوت را در داخل و خارج سلول های بیگانه خوار جستجو شد.(۱۵)

کشت انگل

در این مطالعه نمونه های تهیه شده به محیط دو فازی NNN منتقل شد که فاز مایع شامل محیط RPMI حاوی پنی سیلین و استرپتومایسین بود. نمونه های کشت داده شده به انکوباتور ۲۲ درجه در آزمایشگاه گروه انگل شناسی دانشگاه تربیت مدرس منتقل شد.

لوله های کشت هر روز در زیر میکروسکوپ معکوس بررسی می شدند تا از وضعیت رشد انگل ها و عدم وجود آلودگی احتمالی اطمینان حاصل شود.(۱۵)

استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA از انگل

روش کار: مراحل استخراج DNA از انگل مطابق با دستور کار شرکت سازنده(سیناژن) می باشد.

اندازه گیری غلظت DNA و تعیین خلوص آن

تعیین غلظت DNA به وسیله اسپکتروفتومتری با جذب نور ماوراء بنفش در طول موج ۲۶۰ انجام شد. به طور معمول جذب در ۲۶۰ نانومتر اندازه گیری می شود که در این طول موج جذب برابر با یک، معادل ۵۰ میکروگرم DNA دو رشته ای در یک میلی لیتر است جذب نور ماوراء بنفش می تواند برای کنترل خلوص DNA نیز استفاده شود. نسبت جذب یک نمونه خالص DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر (A260/A280) برابر ۱/۸ می باشد. نسبت کمتر از ۱/۸ نمایانگر وجود پروتئین یا فنل در رسوب است و نسبت بالاتر از ۲ نشانه وجود RNA در نمونه می باشد.(۱۶)

طراحی پرایمرها

طراحی پرایمرهای Forward و Reverse، توالی اطلاعات DNA ژن کد کننده آنتی ژن،(۱۷)، با استفاده از اطلاعات نواحی 18S و ITS1 از ژن rRNA و با کمک نرم افزار GenRuner، جفت پرایمرها با استفاده از شماره دستیابیJN005823.1 به صورت زیر طراحی شد:

F: TCCGCCCGAAAGTTCACCGATA
R: CCAAGTCATCCATCGCGACACG

جدول شماره ۱. مواد و مقادیر به کار رفته برای آزمایش PCR

نوع ماده	مقدار برحسب میکرولیتر	غلظت نهایی
Taq Master Mix	۱۲/۵	۱ X
Forward Primer	۱	۱-۰/۱ میکرومولار
Reverse Primer	۱	۱-۰/۱ میکرومولار
Template DNA	۸	۱میکروگرم-۱۰ پیکوگرم
Sterile Deionized Water	۲/۵	-
حجم کل	۲۵	-

مواد ذکر شده در جدول شماره ۱ درون ویال ۰/۵ میلی لیتری ریخته شد و پس از ورتکس و spin در داخل دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد و طبق برنامه زیر PCR انجام شد:

Initial Denaturation ۵ دقیقه $94^{\circ}C$، Denaturation ۶۰ ثانیه $94^{\circ}C$، Annealing ۳۰ ثانیه $54^{\circ}C$، Extension ۴۵ ثانیه $72^{\circ}C$؛ سه مرحله اخیر ۳۰ سیکل تکرار شد و در نهایت واکنش PCR با Final Extension ۵ دقیقه $72^{\circ}C$ به اتمام رسید.

بررسی محصول PCR

کاربردی ترین روش بررسی محصول PCR و تکثیر قطعه موردنظر ، الکتروفورز محصولات PCR در

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-11-26]

کنار مارکر بر روی ژل آگاروز است. با توجه به اندازه قطعه حدود bp ۴۰۰ از آگاروز ۱ درصد جهت الکتروفورز استفاده شد. سپس محصول DNA را می توان تحت تابش نور ماوراء بنفش(UV) مشاهده کرد. بقیه محصول PCR برای تعیین توالی به شرکت فزاپژوه فرستاده شد.

برش آنزیمی به روش RFLP

آنزیم مورد استفاده در این مرحله آنزیم XapI(ApoI) بوده که از شرکت Fermentas خریداری شد. این آنزیم قادر است توالی 5́ AA– TT ´3 را پیدا کرده و در آن ناحیه برش ایجاد کند. برای این منظور محصولات PCR را همراه بافرتانگو و آنزیم در دمای ۳۷ درجه به مدت ۱۶ ساعت در بن ماری قرارداده شد. سپس محصول موردنظر بر روی ژل آگاروز الکتروفورز شد. با توجه به اندازه قطعات به دست آمده پس از هضم آنزیمی از ژل آگاروز ۳ درصد استفاده شد. مقادیر به کار رفته عبارتند از ۲۰ میکرولیتر محصول PCR، ۸ میکرولیتر آب مقطر نوکلئاز فری، ۲ میکرولیتر بافر تانگو 10X و ۱ واحد آنزیم می باشد.(۱۶)

یافته های پژوهش

در محیط کشت دی فازیک NNN، انگل در عرض ۳ روز تا یک هفته ظاهر گردید. سپس انگل ها به محیط مایع RPMI 1640 دارای FCS10% منتقل شدند که پس از چند روز با محیط جدید سازگار شدند و شروع به تکثیر در تعداد فراوان کردند.

در این مطالعه ۳۵ بیمار مبتلا به لیشمانیوز جلدی بررسی شد که نتایج به دست آمده بدین ترتیب می باشد. نتایج به دست آمده با روش های لام مستقیم و رنگ آمیزی گیمسا و کشت در محیط NNN برای هر ۳۵ مورد مثبت بود. نتایج به دست آمده به تفکیک سن، جنس، محل ابتلا، تعداد زخم و نواحی آلوده با استفاده از پرسش نامه بدین ترتیب به دست آمد. جنس مذکر ۲۲ مورد(۶۲/۸۶ درصد) و جنس مونث ۱۳ مورد(۳۷/۱۴ درصد). توزیع فراوانی گروه های سنی مبتلا در جدول شماره ۲ آمده است.

جدول شماره ۲. توزیع فراوانی و درصد زخم سالک بر اساس سن مبتلایان به سالک

گروه های سنی	۹-۱ سال	۱۹-۱۰ سال	۲۹-۲۰ سال	۳۹-۳۰ سال	۴۹-۴۰ سال	بالای ۵۰ سال	جمع
فراوانی	۵	۱۱	۸	۶	۳	۲	۳۵
درصد	۱۴,۲۹	۳۱,۴۳	۲۲,۸۶	۱۷,۱۴	۸,۵۷	۵,۷۱	۱۰۰

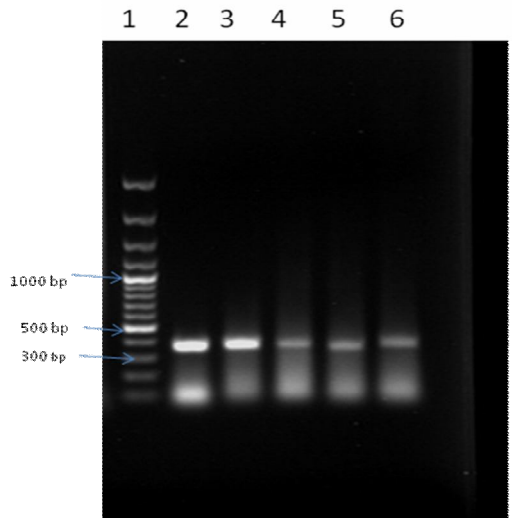
در این بررسی ۱۸ مورد از استان اصفهان(اطراف اصفهان، اردستان، کاشان و سمیرم)، ۲ مورد از کرمان(کانون آلودگی سیرجان)، ۴ مورد خراسان(۲ مورد مشهد و ۲ مورد اسفراین)، ۲ مورد بوشهر ۳ مورد سمنان(کانون آلودگی دامغان) و ۱ مورد از قم به دست آمد. اطلاعات مربوط به فراوانی و درصد فراوانی محل زخم در جدول شماره ۳ آمده است.

جدول شماره ۳. توزیع فراوانی و درصد زخم سالک بر اساس محل زخم بیماران مراجعه کننده به بیمارستان رازی، تهران، سال ۱۳۸۹

محل زخم	صورت	پا	دست	تنه	دست و پا	دست و صورت	جمع
فراوانی	۱۰	۳	۱۸	۱	۲	۱	۳۵
درصد فراوانی	۲۸,۵۷	۸,۵۷	۵۱,۴۳	۲,۸۶	۵,۷۱	۲,۸۶	۱۰۰

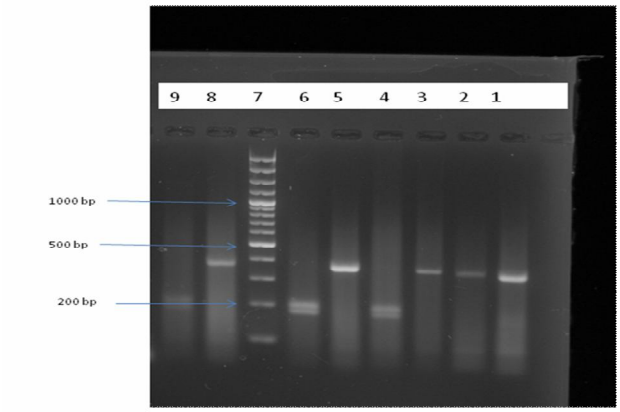
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-11-26]

نتایج به دست آمده از محصول PCR برای نمونه های جدا شده از بیماران مبتلا به لیشمانیوز در شکل شماره ۱ آمده است.



شکل شماره ۱. الکتروفورز محصولات PCR گونه های مختلف عامل لیشمانیوز جلدی(bp)۶۹-۳۵۰
-ردیف اول از سمت چپ-مارکر با وزن ملکولی bp100
-ردیف های۲-۳-٤ و ٦ از سمت چپ-لیشمانیا ماژور
-ردیف ۵ لیشمانیا ترو پیکا

بر اساس روش PCR-RFLP دو مورد L.tropica و ۳۳ مورد L.major به دست آمد. در این نتایج موارد لیشمانیا ترو پیکا چون آنزیم بر آن بی اثر است به صورت تک باند و موارد لیشمانیا ماژور به صورت ۲ باند قابل مشاهده است(شکل شماره ۲). نتایج نشان داد که به جز ۲ نمونه که از مشهد جدا شده بودند و لیشمانیا ترو پیکا تشخیص داده شده اند بقیه نمونه ها همگی لیشمانیا ماژور بودند.



شکل شماره ۲ . نتایج RFLP بعد از تاثیر آنزیم ApoI، نمونه ها به ترتیب از طرف راست:
۱-قطعه هضم نشده(PCR) ترو پیکا
۲-قطعه هضم شده(RFLP) ترو پیکا
۳ و ۵-قطعات هضم نشده(PCR) ماژور
٤ و ٦-قطعه هضم شده(RFLP) ماژور
۷-M- مارکر با وزن ملکولی bp100
۸-قطعه هضم نشده(PCR) لیشمانیا ماژور سوش استاندارد
۹- قطعه هضم شده(RFLP) لیشمانیا ماژور سوش استاندارد

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-11-26]

نتایج به دست آمده از تعیین توالی نیز گونه های لیشمانیا ماژور و لیشمانیا تروپیکا را تایید کرد. نمونه های لیشمانیا ماژور با نمونه استاندارد سویه ایرانی یعنی MRHO/IR/75/ER ۹۵درصد شباهت داشتند.

بحث و نتیجه گیری

لیشمانیوز بیماری وسیع الطیف انگلی است که کم و بیش از سراسر جهان گزارش می شود. برای کنترل بیماری شناسایی گونه برای مبارزه با ناقلین و مخازن ارزشمند می باشد. هم چنین تشخیص بیماری برای درمان سریع نیز اهمیت دارد. در این بررسی بیشترین موارد یافت شده مربوط به گونه لیشمانیا ماژور تشخیص داده شد. در استان خراسان علاوه بر لیشمانیا ماژور، لیشمانیا تروپیکا نیز یافت گردید.

در جهان تعداد موارد جدید لیشمانیوز سالانه ۲ میلیون نفر تخمین زده می شود و ۲۰۰ میلیون نفر در معرض خطر ابتلا هستند که از این تعداد ۳۰۰ هزار نفر سالانه مبتلا می شوند. لیشمانیوزیس بین ۱۰۰ تا ۲۰۰ روز از عمر هر فرد می کاهد و علت ۵۰۰۰ مرگ و میر در سال است. میزان بروز بیماری از سال ۱۳۶۲ تا ۱۳۷۸ حدود۲۰ تا ۴۰ مورد در هر صد هزار نفر است. لیشمانیوز جلدی در کانون های مختلف کشور ایران از هر دو نوع لیشمانیا ماژور و لیشمانیا تروپیکا است. در سال ۱۳۷۷یزد با بروز ۱۶۹ مورد در صد هزار نفر در رده اول، استان های ایلام، فارس و اصفهان با بروز بین ۸۴ تا ۱۲۷مورد در هر صد هزار نفر در رده دوم و استان خراسان و خوزستان با آلودگی ۴۲ تا ۸۴ مورد در هر صد هزار نفر در رده سوم قرار گرفته است. استان های زنجان و گیلان بدون گزارش موارد مثبت از مناطق پاک کشور محسوب شده اند.(۴-۳)

بیشتر روش های متداول که برای تشخیص مستقیم انگل استفاده می شود. شامل آزمایش های میکروسکوپی است که از حساسیت پایینی برخوردار بوده به دلیل این که در برخی از گونه ها تعداد انگل کم است، و در طی کشت انگل مشکلات ناشی از آلودگی محیط های کشت وجود دارد. تشخیص با استفاده از ژن ITS1 و روش PCR سریع و دارای حساسیت بالا می باشد.

در سال ۲۰۰۸ اسپاناکوس و همکاران با استفاده از این ژن و آنزیم Apo1 در یونان باندهای مشابهی را برای لیشمانیا ماژور و تروپیکا به دست آورده بودند.(۱۷)

نتایج به دست آمده از تحقیق مراغی و همکاران در سال ۲۰۰۷ در خوزستان با استفاده از روش Nested-PCR برای تعیین گونه بیشترین موارد لیشمانیوز جلدی از نوع L.major تشخیص داده شد که با نتایج به دست آمده از این تحقیق مطابقت دارد.(۱۸)

در سال ۲۰۰۸ کاظمی و همکاران با استفاده از نمونه های لیشمانیای رنگ آمیزی شده با گیمسا توانستند نمونه ها را از لام جدا کرده و با استفاده از تکنیک PCR-RFLP سه گونه لیشمانیای موجود در ایران را با استفاده از ژن ITS1 و آنزیم HaeIII تشخیص دهند.(۱۹)

در سال ۲۰۰۹ واعظ نیا و همکاران با استفاده از ژن مینی اکسون و تکنیک PCR-RFLP با استفاده از آنزیم HaeIII در مشهد ۳۴ درصد از مبتلایان را لیشمانیا ماژور و ۶۶ درصد را لیشمانیا تروپیکا تشخیص داده بودند که در این تحقیق پس از هضم آنزیمی برای نمونه های لیشمانیا تروپیکا دو باند و برای نمونه های لیشمانیا ماژور یک باند تشخیص داده شد.(۲۰)

در این تحقیق از نمونه های جدا شده از بیماران ایرانی که از مناطق مختلف ایران جمع آوری شده بود پس از انجام PCR و تکثیرژن ITS1، برای اولین بار در ایران از آنزیم Apo1 برای هضم آنزیمی استفاده شد و برای تعیین گونه های لیشمانیوز جلدی جدا شده از ایران مناسب تشخیص داده شد.

References

1-Berman JD. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 years. Clin Infect Dis 1997;24:684-703.

2-Sinha PK, Pandey K, Bhattacharya SK. Diagnosis & management of leishmania/ HIV co-infection. Indian J Med Res 2005; 121:407-14.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-11-26]

3-Rodrigues EH, Felinto de Brito ME, Mendonça MG, Werkhäuser RP, Coutinho EM, Souza WV, et al. Evaluation of PCR for diagnosis of American cutaneous leishaniasis in an area of endemicity in northeastern Brazil. J Clin Microbiol 2002;40: 3572-6.
4-Nicolas L, Milon G, Prina N. Rapid differentiation of Old World Leishmania species by LightCycler polymerase chain reaction and melting curve analysis. J Microbiol Methods 2002;51:295-9.
5-Oliveira FS, Pirmez C, Pires MQ, Brazil RP, Pacheco RS. PCR-based diagnosis for detection of Leishmania in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. Vet Parasitol 2005;129:219-27.
6-Al-Jawabreh A, Schoenian G, Hamarsheh O, Presber W. Clinical diagnosis of cutaneous leishmaniasis: A comparison study between standardized graded direct microscopy and ITS-PCR of a Giemsastained smears. Acta Tropica 2006;99:55-61.
7-Toz SO, Nasereddin A, Ozbel Y, Ertabaklar H, Culha G, Sevil N, et al. Leishmaniasis in Turkey: molecular characterization of Leishmania from human and canine clinical samples. Trop Med Int Health 2009;14:1401-6.
8-Schnian G, Nasereddine 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: 349-58.
9-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. J Clin Microbiol 2003;41:3147-53.
10-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;115:339-43.
11-Khatri ML, Di Muccio T, Gramiccia M. Cutaneous leishmaniasis in North-Western Yemen: a clinicoepidemiologic study and Leishmania species identification by polymerase chain reactionrestriction fragment length polymorphism analysis. J Am Acad Dermatol 2009;61:e15-21.
12-El Tai NO, El Fari M, Mauricio I, Miles MA,OskamL, El Safi S, et al. Leishmania donovani: intraspecific polymorphisms of Sudanese isolates revealed by PCR based analyses and DNA sequencing. Exper Parasitol 2001;97:35-44.
13-Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, editors. Molecular cloning: A laboratory manual, Second Edition. Plainview: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.
14-Spanakos G, Piperaki ET, Menounos PG, Tegos N, Flemetakis A, Vakalis NC. Detection and species identification of Old World Leishmania in clinical samples using a PCR-based method. Trans R Soc Trop Med Hyg 2008;102:46-53.
15-Maraghi S, Samarbaf Zadeh A, Sarlak AA, Ghasemian M, Vazirianzadeh B. Identification of Cutaneous Leishmaniasis Agents by Nested Polymerase Chain Reaction(Nested-PCR) in Shush City, Khuzestan Province, Iran. Iranian J Parasitol 2007;2: 13-5.
16-Kazemi-Rad E, Mohebali M, Hajjaran1 H, Rezaei1 S, Mamishi S. Diagnosis and Characterization of Leishmania Species in Giemsa-Stained slides by PCR-RFLP. Iranian J Publ Health 2008;37:54-60.
17-Vaeznia H, Dalimi A, Sadraei J, Pirstani M. Determination of Leishmania species causing cutaneous leishmaniasis in Mashhad by PCR-RFLP method. Arch Razi Inst 2009;64:39-44.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-11-26]

Detection of Cutaneous Leishmanioasis Isolated From Iranian Patients By Using ITS1 Gene and Apol Enzyme via PCR-RFLP Molecular Method

Behesti N[1], Ghapharifar F[1], Dalimi Asl A.H[1], Eslami Rad Z[2], Sharifi Z[3], Farivar Sadri M[4], Ebrahimi P[1]*

(Received: 14 Nov. 2010 Accepted: 16 Oct. 2011)

Abstract

Introduction: Leishmaniasis is one of the important endemic diseases in Iran and is divided into cutaneous and visceral Leishmaniasis. Since determining the type of the parasite is effective in the controlling and preventing of the disease, we sought to find a method for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis.

Materials & Methods: In this research 35 cutaneous leishmaniasis patients from different part of Iran [8 infectious cases from the province of Isfe-han and its margins namely, Ardestan, Kashan and Samiram; 2 cases from Kerman (the foci of the infection was Sirjan), 4 cases from Khorasan, 2 cases from Mashhad, 2 cases from Esfraeian, 2 casese from Boshehr, 3 cases from Semnan (the foci of the infection was Damghan) and 1 case from ghom] were collected. After preparing the direct slide DNA extracted from all patients, polymerase chain reaction (PCR) was done for the gene of ITS1.

Findings: The results of PCR indicated that all of the cases were positive and showed DNA fragment bands in the size range of 69-350 bp. The results from restriction fragment length of polymorphism (RFLP) indicated that 94% (33 persons) and 6% (2 persons) of the cases were detected as Leishmania major and Leishmania tropica, respectively.

Discussion & Conclusion: These results showed that PCR-RFLP method by using Apo1gene is suitable for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis caused by leishmania species.

Keywords: cutaneous leishmaniasis, ITS1, PCR-RFLP, Apo1

1. Dept of parasitology, Faculty of Medicine, Tarbiat Modarres Universiy, Tehran, Iran
2. Dept of parasitology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
3. Dept of Microbiology, High Institute for Medical Research and Education, Tehran Transfusion Research Center, Tehran, Iran
4. Dept of Patology, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
**(corresponding author)*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-11-26]