Original Article

Frequency and Molecular Identification of *Leishmania* Parasites in Smears Prepared from Skin Lesions of Patients Referred to Health Centers of Ilam Province by Digestion of the rDNA-ITS1 Gene

Eskandar Gholami-Parizad[1], Naseh Maleki Ravasan[2], Elahe Gholami-Parizad[3], Fateh Karimian[1,4*], Behrooz Karimian[5]

1- Instructor, Department of General Health, Faculty of Health, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran
2- Associated Professor, Malaria and Vector Research Group (MVRG), Biotechnology Research Center (BRC), Pasteur Institute of Iran (PII), Tehran, Iran
3- BSC, Research Centre of Clinical Microbiology, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran
4- Ph.D. Candidate, Department of Medical Entomology and Vector Control, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
5- BSC, Department of Biochemistry, School of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

**Corresponding Address: PO.Box: 14155-6446, Department of Medical Entomology and Vector Control, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
Email: karimianfateh@yahoo.com

Received: 16/Feb/2015, Accepted: 06/Oct/2015

Abstract

Objective: Ilam is a border province and a high risk zone for zoonotic cutaneous leishmaniasis (ZCL). Identification of *Leishmania* parasite species in clinical infections is a prerequisite for planning appropriate control measures. This study investigates the demographic characteristics of patients and molecular epidemiology of *Leishmania* parasites in the skin lesions of patients from Ilam Province.

Methods: A total of 106 cases of suspected cutaneous leishmaniasis were detected passively and microscopic slides prepared from their active skin lesions. We randomly selected 50 slides. A fragment of the rDNA-ITS1 gene was amplified after which the PCR products digested with *Hae*III restriction enzyme. There were 18 samples sequenced and their phylogenetic relationships compared with sequences retrieved from GenBank.

Results: *Leishmania* amastigotes were detected in 100 slides. The highest and lowest distribution of cases was from the Moosian and Dehloran districts, respectively. There were 68.9% males and 31.1% of cases were women. The RFLP pattern of all samples was similar to *Leishmania major*. Phylogenetic relationships displayed great similarity between our sequences and those of *Leishmania major* parasites from sandflies trapped in Ilam and South Khorasan Provinces and human hosts from Esfarayen, Mahshahr and Afghanistan plus *Leishmania mexicana* of Venezuelan origin classified together in the same clade.

Conclusion: Due to homogeneous morphology, problems associated with the cultivation of *Leishmania* and the two-step molecular identification process, the rDNA-ITS1-RFLP method has gained considerable attention in recent years. This method could be used as a very sensitive, simple, rapid and inexpensive method to detect *Leishmania* parasites in a variety of clinical and non-clinical samples.

Keywords: *Leishmania major*, rDNA-ITS1, RFLP, Ilam, High risk

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol. 18 (2015-2016), No.3, Pages: 75-85

مقاله اصیل

بررسی فراوانی و شناسایی مولکولی انگل‌های لیشمانیا در اسمیرهای تهیه شده از ضایعات پوستی بیماران مراجعه کننده به مراکز بهداشتی– درمانی استان ایلام با استفاده از هضم آنزیمی ژن rDNA-ITS1

اسکندر غلامی پریزاد[۱]، ناصح ملکی راواسان[۲]، الهه غلامی پریزاد[۳]، فاتح کریمیان[۱،۴*]، بهروز کریمیان[۵]

۱- مربی، گروه بهداشت عمومی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران
۲- استادیار، گروه تحقیقات مالاریا و ناقلین، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتوپاستور ایران، تهران، ایران
۳- کارشناس، مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران
۴- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۵- کارشناس، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، صندوق پستی: ۶۴۴۶-۱۴۱۵۵، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه حشره شناسی و مبارزه با ناقلین
Email: karimianfateh@yahoo.com

دریافت مقاله: ۹۳/۱۱/۲۷ پذیرش مقاله: ۹۴/۰۷/۱۴

چکیده

هدف: استان ایلام منطقه مرزی و پرخطر برای لیشمانیازیس جلدی روستایی است. شناسایی گونه انگل‌های لیشمانیا در عفونت‌های بالینی، پیش نیاز طراحی اقدامات کنترلی مناسب است. در این مطالعه مشخصات دموگرافیک بیماران و اپیدمیولوژی مولکولی انگل‌های لیشمانیای ضایعات پوستی بیماران شهرهای مختلف استان ایلام بررسی شد.

مواد و روش‌ها: تعداد ۱۰۶ مورد مشکوک به لیشمانیازیس جلدی، از طریق غیرفعال بیماریابی و از زخم فعال آن‌ها لام میکروسکوپی تهیه شد. ۵۰ لام به‌صورت تصادفی انتخاب شد. بعد از تکثیر بخشی از ژن rDNA-ITS1، محصول PCR با آنزیم *Hae*III هضم شد. ۱۸ نمونه تعیین توالی و روابط فیلوژنی آن‌ها با توالی‌های بانک جهانی ژن مقایسه شد.

نتایج: آماستیگوت‌های لیشمانیا در ۱۰۰ لام تشخیص داده شدند. بیشترین و کمترین توزیع موارد بیماری به‌ترتیب مربوط به دهلران و موسیان بود. ۶۹ درصد موارد مردان و ۳۱ درصد موارد زن بودند. الگوی هضم آنزیمی همه نمونه‌ها، مشابه انگل لیشمانیا ماژور بود. بررسی روابط فیلوژنی نشان داد که توالی‌های مطالعه، نزدیکی زیادی با توالی‌های انگل‌های لیشمانیا ماژور جدا شده از پشه خاکی‌های استان‌های ایلام و خراسان جنوبی و میزبان انسانی اسفراین، ماهشهر و افغانستان و نیز انگل لیشمانیا مکزیکانا از منشأ کشور ونزوئلا داشته و همه توالی‌ها در یک شاخه واقع شده‌اند.

نتیجه‌گیری: به علت ریخت‌شناسی مشابه لیشمانیاها، مشکلات مربوط به کشت انگل و شناسایی مولکولی دو مرحله‌ای، روش هضم آنزیمی rDNA-ITS1 در سال‌های اخیر کاربرد زیادی داشته است. این روش خیلی حساس، ساده، سریع و ارزان بود و می‌تواند در تشخیص گونه انگل لیشمانیا در انواع نمونه‌های بالینی و غیر بالینی به کار رود.

کلیدواژگان: لیشمانیا ماژور، هضم آنزیمی rDNA-ITS1، ایلام، پرخطر

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۸، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۴، صفحات: ۷۵-۸۵

مقدمه

لیشمانیازیس‌ها (Leishmaniasis) یکی از مهم‌ترین بیماری‌های انگلی ناقل‌زاد در دنیا هستند که با گستره وسیعی از علایم بالینی جزو بیماری‌های غفلت شده (Neglected diseases) طبقه‌بندی می‌شوند [۱]. در دنیا ۳۵۰ میلیون نفر در معرض خطر بیماری هستند و سالانه حدود دو میلیون مورد جدید بیماری اتفاق می‌افتد [۲]. ۹۰ درصد موارد لیشمانیازیس جلدی دنیا در ده کشور افغانستان، الجزایر، ایران، عربستان سعودی، سوریه، بولیوی، برزیل، کلمبیا، نیکاراگوئه و پرو رخ می‌دهد [۳]. بر اساس گزارش‌های رسمی سازمان بهداشت جهانی، در ایران ۲٤٥۸٦ مورد لیشمانیازیس جلدی طی سال‌های ۱۹۹۸–۲۰۰۹ گزارش شده است [٤]. لیشمانیازیس جلدی روستایی (Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis: ZCL) یک بیماری در حال رشد و فزاینده است که موجب بیماری‌زایی شدید و بد شکلی موضع درگیر شده و مناطق روستایی ۱۷ استان از ۳۱ استان کشور را درگیر می‌نماید [٥]. ژربیل بزرگ (*Rhombomys opimus*) مخزن حیوانی اصلی در کانون‌های شمال شرق و مرکز ایران، جیراد دم قرمز (*Meriones libycus*) مخزن حیوانی اصلی در برخی از بخش‌های مرکز و جنوب کشور، ژربیل هندی یا *Tatera indica* مخزن اصلی بیماری در جنوب شرق کشور و ژربیل صحرایی یا *Meriones hurrianae* مخزن بیماری در جنوب شرق ایران هستند [٦]. ناقل اصلی بیماری به انسان و بین ژربیل‌ها فلبوتوموس پاپاتاسی (*Phlebotomus papatasi*) است [٥]. اما پشه خاکی‌های دیگر مانند فلبوتوموس کوکازیکوس (*P. caucasicus*)، فلبوتوموس مونگولنسیس (*P. mongolensis*) و فلبوتوموس انصاری (*P. ansarii*) ناقلین بیماری بین ژربیل‌ها و جیرادها محسوب می‌شوند [٥].

استان ایلام منطقه مرزی و پرخطر (High risk) برای لیشمانیازیس جلدی روستایی است. این استان از غرب با کشور عراق، از جنوب با استان خوزستان، از شرق با استان لرستان و از شمال با استان کرمانشاه همسایه است. بنابراین توسط سه کانون بیماری لیشمانیوز جلدی از داخل ایران لرستان [۷]، خوزستان [۸] و کرمانشاه [۹] و یک کانون از خارج ایران (کشور عراق [۱۰]) احاطه شده است.

در سال‌های اخیر مطالعه روی لیشمانیازیس‌ها در بین محققان ایرانی اهمیت بالایی پیدا کرده است و ضرورت شناخت همه جانبه اپیدمیولوژی بیماری بیش از پیش آشکار شده است [۱۱–۱٦] مشخص نمودن گونه انگل لیشمانیا (*Leishmania*) در عفونت‌های بالینی دارای اهمیت است زیرا ممکن است گونه‌های مختلف درمان‌های مختلف نیاز داشته باشند و نیز از نظر اپیدمیولوژیکی نیز ارزشمند خواهند بود چرا که توزیع گونه لیشمانیا در انسان، میزبان حیوانی و پشه خاکی ناقل پیش نیاز طراحی اقدامات کنترلی است.

با توجه به حساسیت پایین روش‌های میکروسکوپی، دشواری‌های جداسازی و کشت انگل [۱۷] و نیز دو مرحله‌ای بودن روش تعیین هویت مولکولی گونه انگل (semi/nested PCR) [۱٥، ۱۸]، تکثیر ژن rDNA-ITS1 (Internal Transcribed Spacer) با آغازگرهای (Primers) اختصاصی و هضم آن با آنزیم *Hae*III بسیار مفید است. بخش‌های مختلف ژن rDNA-ITS در اپیدمیولوژی مولکولی لیشمانیازیس اهمیت دارد. سه بخش عمده این ژن شامل زیر واحد کوچک ریبوزوم (Small Subunit: SSU)، بخش ۵/۸S و زیر واحد بزرگ ریبوزوم (Large Subunit: LSU) است.

در انگل های لیشمانیای دنیای قدیم و جدید، تنوع بین/درون گونه‌ای زیادی در نواحی ITS1 و ITS2 مشاهده شده که چندین نسخه از آن‌ها در اپران (Operon) ریبوزوم وجود دارد. هضم آنزیمی rDNA-ITS1 نمونه‌ای از ابزارهایی است که از این ویژگی بهره‌برداری می‌نماید. در واقع این روش، یک روش تشخیص مولکولی خیلی حساس لیشمانیا است و مناسب برای انواع مختلفی از نمونه‌های بالینی شامل آسپیره‌های مغز استخوان یا گره لنفاوی، خون محیطی، تراشه‌های پوستی، پشه خاکی‌های له شده است. بعد از تکثیر این بخش، تفکیک گونه‌ها از طریق تعیین توالی یا هضم با آنزیم اندونوکلئاز (جدول ۱) امکان‌پذیر است [۱۹، ۲۰].

جدول ۱ مرور اجمالی الگوی برش ITS1-RFLP گونه‌های مختلف انگل لیشمانیا با آنزیم *Hae*III [۲۱]

آنزیم محدود کننده / قطعات (جفت باز) ✂	لیشمانیا دونوانی *L. donovani*	لیشمانیا اینفانتوم *L. infantum*	لیشمانیا چاگاسی *L. chagasi*	لیشمانیا آتیوپیکا *L. aethiopica*	لیشمانیا تروپیکا *L. tropica*	لیشمانیا ماژور *L. major*	لیشمانیا تورانیکا *L. turanica*	لیشمانیا مکزیکانا *L. mexicana*	لیشمانیا آمازونسیس *L. amazonensis*	لیشمانیا برازیلنسیس *L. braziliensis*	لیشمانیا گایانسیس *L. guyanensis*	لیشمانیا پانامانسیس *L. panamanensis*
*Hae*III	۱۶۴	۱۸۴	۱۸۴	۲۰۰	۱۸۵		۲۰۳	۱۸۶				
	۷۵	۷۲	۷۲	۵۷	۵۷	۲۰۳	۵۷	۸۸	۱۸۶	۱۵۶	۱۵۶	۱۵۶
	۵۴	۵۵	۵۵	۵۴	۵۳	۱۳۲	۵۳	۵۹	۱۴۲	۱۴۳	۱۳۷	۱۳۹
				۲۳	۲۴		۲۴					

این مطالعه به‌منظور درک بیشتر اپیدمیولوژی لیشمانیازیس جلدی در پنج شهر استان ایلام انجام شد. ابتدا مشخصات دموگرافیک بیماران مراجعه کننده به مراکز بهداشتی درمانی استان ایلام ثبت و اپیدمیولوژی مولکولی انگل‌های لیشمانیای موجود در اسمیر های تهیه شده از ضایعات پوستی بیماران بررسی شد. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، ناحیه ITS1 ایران ریبوزوم انگل‌های لیشمانیا تکثیر و سپس محصول PCR آن‌ها با کمک آنزیم اندونوکلئاز اختصاصی هضم شد. این روش بدون نیاز به تعیین توالی و سایر آزمایش‌های تخصصی می‌تواند به‌عنوان یک روش تشخیص گونه لیشمانیا به‌کار برود.

مواد و روش‌ها

مناطق مورد مطالعه

استان ایلام درغرب سلسله جبال زاگرس بین ۳۱ درجه و ۵۸ دقیقه تا ۳۴ درجه و ۱۵ دقیقه عرض شمالی و ۴۵ درجه و ۲۴ دقیقه تا ۴۸ درجه و ۱۰ دقیقه طول شرقی در گوشه غربی کشور قرارگرفته است و دارای دو نوع آب و هوای نیمه مرطوب سرد در شمال استان با متوسط میزان بارندگی ۶۳۹ میلی‌متر در سال و بیابانی گرم در جنوب استان با متوسط میزان بارندگی ۲۰۰ میلی‌متر در سال است. این استان دارای هفت شهر مهم آبدانان، ایلام، ایوان، سرابله، دره شهر، دهلران و مهران است و بر اساس سرشماری سال ۲۰۱۱ دارای ۵۵۷/۵۹۹ نفر جمعیت است. در این بررسی زخم فعال بیماران استان ایلام شامل پنج شهر مهران، دشت عباس (جز شهرستان دهلران)، موسیان (جز شهرستان دهلران)، دهلران و آبدانان مطالعه شد.

بیماریابی

در این مطالعه، بیماریابی به‌صورت غیر فعال انجام شد؛ بدین صورت که از افراد مراجعه کننده به مراکز بهداشتی – درمانی شهرهای مختلف استان ایلام و دارای زخم مشکوک به انگل لیشمانیا در نواحی مختلف بدن (صورت، دست، ساعد، کمر، پا)، توسط پزشک مستقر در مرکز و کارشناس مربوط معاینه بالینی به‌عمل می‌آمد. سپس مشخصات دموگرافیک بیماران (سن، جنس، شغل و محل زندگی) در فرم‌های مخصوص ثبت و بعد از بررسی کلی از زخم فعال آن‌ها نمونه‌برداری انجام شد.

نمونه‌برداری از ضایعات مشکوک به لیشمانیازیس جلدی

نمونه‌برداری از ضایعات جلدی بر اساس روش‌های توصیف شده در منابع [۲۱] انجام شد. با رعایت اصول

بهداشتی محل زخم‌ها چندین مرتبه با الکل ۷۰ درصد تمیز و ضد عفونی شد. چنانچه روی ضایعه کبره یا هر گونه چرک وجود داشت برطرف شد. بعد از تبخیر الکل، لبه خارجی ملتهب و متورم توسط دو انگشت شست و سبابه محکم گرفته شد. به کمک واکسینواستیل (Vaccinosteel) استریل یا اسکالپل (Scalpel) نوک باریک شکافی به عمق یک میلی‌متر در منطقه نگه داشته شده بین دو انگشت ایجاد شد. از عمق شکاف ایجاد شده چند خراش به طرف سطح و مرکز ضایعه ایجاد و از بافت و خون‌آبه‌های تراوش شده چندین اسمیر روی لام ایجاد شد. بعد از ثبت مشخصات بیمار روی لام و تثبیت کردن آن، رنگ‌آمیزی با رنگ گیمسا (Giemsa) انجام شد.

بررسی‌های میکروسکوپی

لام‌ها در زیر میکروسکوپ نوری و با کمک عدسی چشمی۱۰ و عدسی‌های شیی ۱۰، ٤۰ و ۱۰۰ (با روغن ایمرسیون و بدون استفاده از لامل) بررسی شد. تشخیص مثبت، مستلزم مشاهده آماستیگوت (Amastigote) لیشمانیا در اسمیرهای رنگ‌آمیزی شده است. در هر لام چندین شان (Field) بررسی می‌شد تا امکان دیدن انگل بیشتر باشد.

بررسی‌های مولکولی

استخراج DNA و PCR

اسمیر روی لام‌ها به کمک اسکالپل به آرامی تراشیده شد و در داخل میکروتیوب‌های ۱/۵ سی‌سی استریل جمع‌آوری شد. استخراج DNA به کمک کیت G-spin™ [G-spin Genomic DNA Extraction Kit (Cell/Tissue), Cat No. 17231] و با دستورالعمل استخراج DNA از بافت انجام شد. در حجم ۲۰ میکرولیتر از واکنش PCR، ۱ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای جلودار LITSR: 5'-CTGGATCATTTTCCG ATG-3' و برگشتی L5.8S: 5'-TGATACCACTTATCG CACTT-3' و ۱ میکرولیتر از DNA استخراج شده از اسمیر لام‌ها به کیت Maxime PCR PreMix Kit (i-[PreMix Taq) Cat. No. 25026] ساخت شرکت iNtRON Bio (کره جنوبی) اضافه شد. بعد از تکثیر حدود ۳۰۰-۳۵۰ جفت باز از ناحیه ITS1، مقدار ۲-۳ میکرولیتر از محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد.

PCR-RFLP.

حدود ۲۰ میکرولیتر از محصول PCR با کیفیت مناسب تهیه و واکنش هضم با آنزیم *Hae*III براساس پروتکل مندرج در منبع ۲۲ انجام شد. بر اساس اطلاعات جدول ۱، آنزیم *Hae*III برای توالی rDNA-ITS1 تکثیر شده لیشمانیا اینفانتوم سه قطعه ۱۸٤، ۷۲ و ۵۵ برای لیشمانیا تروپیکا چهار باند ۱۸۵، ۵۷، ۵۳ و ۲٤ و برای لیشمانیا ماژور دو باند ۲۰۳ و ۱۳۲ جفت بازی ایجاد می‌نماید.

تعیین توالی

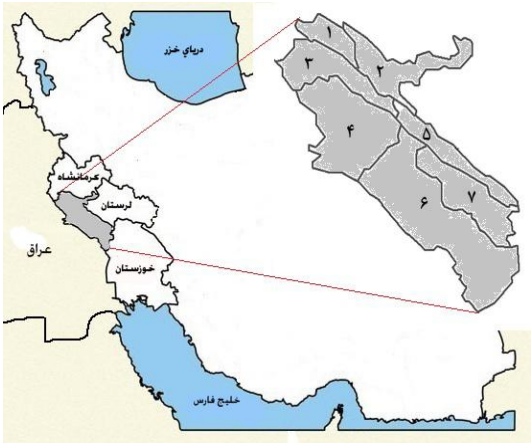
از بین نمونه‌هایی که در آن‌ها تکثیر ناحیه ITS1 موفق بود، تعداد ۱۸ نمونه به‌طور تصادفی انتخاب و تعیین توالی شد. بدین صورت که ۳۰ میکرولیتر از محصول واکنش با کیفیت مناسب تهیه و از طریق شرکت تکاپو زیست (ایران) به شرکت Bioneer در کشور کره ارسال و تعیین توالی با استفاده از هر دوی آغازگرهای جلودار و برگشتی انجام شد. میزان مشابهت توالی‌های مورد اعتماد، با نمونه‌های ثبت شده در پایگاه داده‌ها به کمک Blast سرور رایج NCBI (Nucleotide collection) انجام و سپس تمامی توالی‌ها در GenBank ثبت شدند.

از نرم‌افزار MEGA5 نیز برای بررسی روابط خویشاوندی توالی‌های این مطالعه و توالی‌های سایر نقاط ایران و کشورهای همسایه و ترسیم درخت فیلوژنی استفاده شد. تأیید موقعیت مکانی توالی‌ها در درخت فیلوژنی با استفاده از تجزیه و تحلیل‌های بیشترین درست‌نمایی Maximum likelihood phylogeny و Bootstrap به ازای ۱۰۰۰ تکرار انجام شد.

نتایج

بررسی‌های میکروسکوپی

در مجموع تعداد ۱۰۶ لام از زخم حاد بیماران مناطق مختلف استان ایلام (شکل ۱) تهیه شد که از آن‌ها ۱۰۰ لام با بررسی های انگل شناسی اولیه از طریق میکروسکوپ، مثبت تشخیص داد شد. اطلاعات دموگرافیک شامل سن، جنس، شغل، محل زندگی، تعداد زخم، محل زخم و نوع انگل جدا شده مربوط به ۱۸ مورد از بیماران در جدول ۲ نشان داده شده است. از مجموع ۱۰۶ مورد، بیشترین توزیع موارد بیماری به‌ترتیب در شهرهای ۱-دهلران (۳۱ مورد)، ۲-مهران (۲۲ مورد)، ۳-دشت عباس (۱۹ مورد)، ٤-آبدانان (۱۸ مورد) و موسیان (۱٦ مورد) بود. تعداد زخم‌های بیماران از ۱ تا ۱۰ متغیر بود. از نظر جنسیت ۷۳ مورد مرد (٦۸/۹ درصد) و ۳۳مورد زن (۳۱/۱ درصد) بودند. دامنه سنی ابتلا در مردان ۳/۵-٥٤ سال، در زنان ۳-٤۸ سال و به‌طور کلی بدون در نظر گرفتن جنسیت ۳ تا ٥٤ سال بود.



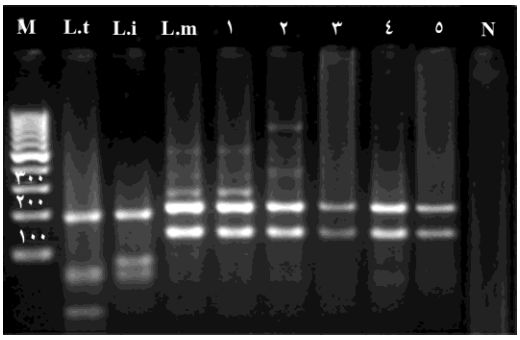
شکل ۱ نقشه استان ایلام نشان‌دهنده شهرهای ۱-ایوان، ۲-سرابله، ۳-ایلام، ٤-مهران، ٥- دره شهر، ٦-دهلران ۷- آبدانان و همسایگان استان ایلام شامل کرمانشاه، لرستان و خوزستان و کشور عراق

جدول ۲ مشخصات دموگرافیک مربوط به ۱۸ مورد از بیماران

کد بیمار	سن	جنسیت	شغل	شهر محل زندگی	تعداد زخم	محل زخم	گونه انگل
۳۲	۲۰	مذکر	سرباز	مهران	۲	پا	لیشمانیا ماژور
F	۳/۵	مذکر	---	مهران	۲	پا و صورت	لیشمانیا ماژور
۳۱	۳۹	مونث	خانه‌دار	مهران	۳	پا	لیشمانیا ماژور
A	۲۰	مذکر	سرباز	مهران	۱	دست	لیشمانیا ماژور
۲٤	٤	مذکر	---	دشت عباس	۱	کمر	لیشمانیا ماژور
۱۱	۲۹	مذکر	کشاورز	موسیان	۲	دست و پا	لیشمانیا ماژور
۱٥	۱۹	مذکر	سرباز	موسیان	۱	صورت	لیشمانیا ماژور
٥	۲۳	مذکر	دانشجو	دهلران	۲	دست و پا	لیشمانیا ماژور
٤	٤	مذکر	---	دهلران	۳	دست و صورت	لیشمانیا ماژور
۲٥	۱۲	مونث	محصل	دشت عباس	۲	دست	لیشمانیا ماژور
۱۳	۲۹	مذکر	کشاورز	موسیان	۲	دست	لیشمانیا ماژور
E	٤۸	مونث	خانه‌دار	دهلران	۳	صورت و پا	لیشمانیا ماژور
H	۳	مونث	---	آبدانان	٤	دست و صورت	لیشمانیا ماژور
D	۲۳	مذکر	دانشجو	دهلران	٥	دست و پا	لیشمانیا ماژور
G	٤٥	مذکر	کشاورز	دشت عباس	۱	صورت	لیشمانیا ماژور
۲۷	۳۰	مونث	خانه‌دار	دشت عباس	۱	ساعد	لیشمانیا ماژور
۲۹	۳	مذکر	---	دشت عباس	۲	صورت و پا	لیشمانیا ماژور
۸	۱٥	مذکر	محصل	دهلران	۳	صورت	لیشمانیا ماژور

بررسی‌های مولکولی

از تعداد ۵۰ نمونه به تصادف انتخاب شده برای بررسی مولکولی، در همه موارد ژن rDNA-ITS1 با موفقیت تکثیر و الگوی RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) همه آن‌ها مانند لیشمانیا ماژور بود (شکل ۲). اگرچه الگوی هضم حاصل از توالی‌های این مطالعه با الگوی توالی لیشمانیا ماژور کاملاً مطابقت می‌نمود ولی با این حال تعداد ۲۱ نمونه برای تعیین توالی انتخاب شد که از آن‌ها تعداد ۱۸ نمونه با موفقیت تعیین توالی شد. بررسی توالی‌ها با نرم‌افزار BLAST نشان داد که همه نمونه‌های تعیین توالی شده متعلق به انگل لیشمانیا ماژور و دارای توالی‌های rDNA-ITS1 کاملاً مشابه است که با شماره‌های دسترسی KF899848-65 در بانک جهانی ژن ثبت شد. درخت فیلوژنی حاصل از تجزیه و تحلیل ۲۴۴–۲۷۰ جفت باز از توالی‌های ITS1 تعداد ۳۰ توالی مستخرج از بانک جهانی ژن نشان داد که نمونه جدا شده از ضایعات پوستی بیمار شماره ۳۱ در شهر مهران با شماره دسترسی KF899859 نزدیکی زیادی با توالی‌های انگل‌های لیشمانیا ماژور جدا شده از پشه خاکی‌های صید شده از استان‌های ایلام و خراسان جنوبی و میزبان انسانی اسفراین، ماه شهر و افغانستان و نیز انگل لیشمانیا مکزیکانا از منشأ کشور ونزوئلا داشته و همه این توالی‌ها در یک شاخه واقع شده است (شکل ۳).



شکل ۲ تجزیه و تحلیل RFLP ژن rDNA-ITS1 برای جدایه‌های مختلف انگل لیشمانیا با آنزیم *Hae*III؛ حروف و شماره‌ها به‌ترتیب از چپ به راست، M برای اندازه نشانگر، L.t برای لیشمانیا تروپیکا، L.i برای لیشمانیا اینفانتوم، L.m برای لیشمانیا ماژور، اعداد ۱–۵ برای نمونه‌های جدا شده از بیماران و N کنترل منفی

شکل ۳ روابط فیلوژنیک بین انگل‌های لیشمانیا ماژور ایران و سایر لیشمانیاهای مشابه بر اساس تجزیه و تحلیل ۲۴۴–۲۷۰ جفت باز از توالی‌های ITS1؛ یک نمونه از توالی‌های این مطالعه با شماره دسترسی KF899859 با توالی‌های ارائه شده توسط نرم‌افزار بلاست مقایسه شده است. اعداد درج شده هر گره نشان دهنده احتمال نتیجه یکسان به ازای ۱۰۰۰ تکرار است. عبارات درج شده در مقابل هر شاخه به‌ترتیب شماره دسترسی، نوع انگل لیشمانیا، میزبان و محل جدا شده است.

بحث

لیشمانیازیس جلدی روستایی، ایران را در زمره ده کشور با موارد بالای بیماری قرار داده است [۳] و هم اکنون مناطق روستایی ۱۷ استان از ۳۱ استان کشور را درگیر نموده است [۵]. در لیشمانیازیس جلدی روستایی، انگل لیشمانیا ماژور بین جوندگان مخزن اغلب توسط فلبوتوموس پاپاتاسی به گردش در می‌آید و گاهاً به میزبان انسانی منتقل می‌شود. در اپیدمیولوژی لیشمانیازیس شناسایی دقیق هر یک از اجزای دخیل در چرخهٔ بیماری بسیار اهمیت دارد. لیشمانیا ماژور عموماً به‌عنوان یک زئونوز (Zoonosis) در نظر گرفته می‌شود و مشخصات آن در انسان به‌صورت زخم‌های متعدد و مرطوب، اغلب در ناحیه دست و پا است. اما سیمای بالینی و اطلاعات دموگرافیک متناقض استان ایلام انجام این مطالعه را ضروری نمود. هدف اصلی این مطالعه بررسی اطلاعات دموگرافیک بیماران و شناسایی مولکولی گونه‌های لیشمانیای آلوده کننده میزبان انسانی در پنج شهر استان ایلام با دو روش مولکولی RFLP و توالی‌یابی مستقیم (Direct sequencing) بود.

عموماً تشخیص بیماری لیشمانیازیس جلدی، با تهیه گسترش از زخم بیماران و رنگ‌آمیزی با رنگ‌هایی مانند گیمسا امکان‌پذیر است. اما در موارد زخم مزمن و تعداد انگل کم، تشخیص به سختی انجام می‌شود. در تشخیص مستقیم امکان تعیین گونه انگل وجود ندارد و برای تشخیص گونه به کشت انگل و تکثیر انبوه آن برای تزریق به حیوان آزمایشگاهی یا روش‌های ایزوآنزیم و مولکولی نیاز است. در سال‌های اخیر روش‌های برپایه DNA در تشخیص لیشمانیازیس‌ها کاربردهای فراوانی داشته‌است [۱۷، ۲۳]. استفاده از روش‌های مولکولی به علت حساسیت، ویژگی و سرعت شناسایی می‌تواند جایگزین روش‌های رایج باشد.

بسته به هدف مطالعه، بخش‌های مختلف ژنوم انگل لیشمانیا مورد توجه قرار می‌گیرد. در حقیقت اهدافی از ژنوم که برای شناسایی اولیه به‌کار می‌روند با اهداف مورد استفاده در تعیین هویت دقیق، متفاوت هستند. در یک مطالعه از سه جایگاه kDNA، rDNA و CPB به سه منظور تعیین لپتوموناد (Leptomonad)، شناسایی کمپلکس انگل و تعیین هویت اعضای کمپلکس لیشمانیا دونووانی استفاده شده بود [۱۸]. در مطالعه حاضر از روش هضم آنزیمی rDNA-ITS1 به‌عنوان یک روش تشخیص مولکولی ساده، سریع و ارزان در تشخیص نمونه‌های بالینی استفاده شد. ساده، سریع و ارزان بدین لحاظ که با یک واکنش PCR استاندارد و یک آنزیم محدود کننده در دسترس (*Hae*III)، شناسایی و تعیین هویت کامل انگل‌های لیشمانیای رایج در ایران به‌دست می‌آید. درستی عملیات تعیین هویت از طریق PCR-RFLP با تعیین توالی نیز مشخص شد. اگر چه آنزیم *Hae*III در ۱۲ گونه مختلف انگل لیشمانیا دارای جایگاه برش است ولی در بعضی موارد (لیشمانیا اینفانتوم/ لیشمانیا دونووانی یا لیشمانیا برازیلنسیس/ لیشمانیا گایاننسیس/ لیشمانیا پاناماننسیس) به علت نزدیکی اندازه طول باندهای برش داده شده در تفکیک گونه‌ها کاربرد زیادی نخواهد داشت. با این وجود تمایز کافی برای تشخیص سه انگل لیشمانیای بیماری‌زای رایج در ایران (لیشمانیا ماژور/ لیشمانیا تروپیکا/ لیشمانیا اینفانتوم) را ایجاد می‌نماید.

در مطالعه حاضر از ۱۰۶ لام تهیه شده ۱۰۰ لام با روش میکروسکوپی مثبت شده بود. در ٦ نمونه باقیمانده ممکن است عوامل جستجوی ناکافی، تجربه نا کافی کارشناس مربوط یا عوامل بیماری‌زای جلدی غیر از لیشمانیا در عدم شناسایی دخیل باشد.

در این مطالعه درخت فیلوژنی ترسیم شده بر اساس ۳۰ توالی تمایز کافی برای تفکیک گونه‌ها و جدایه‌ها ایجاد نمود. طوری که برای لیشمانیا ماژور تعداد چهار هاپلوتایپ براساس توالی‌های تجزیه و تحلیل شده نشان داده شد. تجزیه و تحلیل توالی‌های مطالعه حاضر نشان داد که همه ۱۸ نمونه تعیین توالی شده متعلق به یک هاپلوتایپ از لیشمانیا ماژور هستند. اما در سایر مطالعات هاپلوتایپ‌های مختلفی از لیشمانیا ماژور گزارش شده است. مثلاً به‌منظور تعیین توزیع جغرافیایی انگل‌های مسبب لیشمانیازیس جلدی و بررسی هتروژنیتی

ژنتیک انگل های لیشمانیا ماژور در مناطق آندمیک ایران مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۲ انجام شده بود. در آن مطالعه تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای بین جدایه‌های مختلف انگل لیشمانیا از کانون های آندمیک مختلف و حتی بین بعضی از جدایه‌های یک کانون آندمیک گزارش شده بود [۲٤].

استان ایلام یکی از ۱۷ کانون اصلی لیشمانیازیس جلدی روستایی در کشور است. این بیماری مشکلات زیادی در دهلران به‌ویژه در موسیان در بین ساکنان و نیروهای نظامی‌ایجاد کرده است [۵]. در مطالعه جهانی و همکاران طی سال‌های ۹۷ تا ۲۰۰۱ از طریق جستجوی غیرفعال لیشمانیازیس جلدی در بین نیروهای نظامی‌استان‌های اصفهان، ایلام، بوشهر، خراسان و خوزستان مشخص شد که تعداد ٦۱۰ مورد لیشمانیازیس جلدی تأیید شده وجود دارد که ۱۵۵ مورد آن‌ها یعنی ۲۵ درصد موارد، مربوط به استان ایلام است [۲۵]. بنابراین لیشمانیازیس جلدی روستایی در این استان یک بیماری شغلی نیز محسوب می‌شود.

در مطالعه مقطعی که از سال ۲۰۰۰–۲۰۰۷ در شهرستان‌های استان ایلام صورت گرفته بود، میزان شیوع بیماری ۱/۲ در هر هزار نفر گزارش شده بود. در دو گروه سنی ۲۰–۲۹ (٤٦/۸ درصد) و ۱۰–۱۹ (۱۷/۳ درصد) بیشترین شیوع بیماری اعلام شده بود. همچنین دو شهر دهلران و مهران بیشترین شیوع بیماری را داشتند [۲٦].

در تحقیق دیگر لیشمانیازیس جلدی در کودکان مدرسه‌ای مناطق مرزی غرب ایران (استان ایلام، شهر مهران) مطالعه شده بود که بالاترین شیوع بیماری در گروه سنی ۱۰–۱٤ معرفی شده بود [۲۷]. سازمان بهداشت جهانی سه طبقه‌بندی کلی هایپواندمیک (Hypoendemic)، هایپراندمیک (Hyperendemic) و مزواندمیک (Mesoendemic) را برای تعیین آندمیسیته لیشمانیازیس جلدی روستایی ارایه نموده است [۲۸]. در مطالعه حاضر بیشترین و کمترین توزیع موارد بیماری به‌ترتیب مربوط به شهرهای دهلران و موسیان گزارش می‌شود. ٦۸/۹ درصد موارد مردان و ۳۱/۱ درصد موارد زن بودند. دامنه سنی ابتلا نیز بدون در نظر گرفتن جنسیت ۳–٥٤ سال به‌دست آمد. شاید دلیل میزان ابتلای بیشتر مردان، مربوط به فعالیت بیرون از اماکن و در معرض بودن بیشترمردان نسبت به زنان باشد.

به‌طور خلاصه با در نظر گرفتن گروه‌های سنی درگیر با بیماری، تعاریف ارایه شده توسط سازمان بهداشت جهانی و موقعیت استان بین کانون های مختلف داخلی و خارجی وضعیت آندمیسیته لیشمانیازیس جلدی روستایی استان ایلام را می توان وضعیت یک منطقه پر خطر نامید که توجه بیشتر مسئولین و مقامات بهداشتی به این کانون پرخطر بیماری را بیش از پیش ضروری می‌نماید.

تشکر و قدردانی

منابع مالی این مطالعه توسط دانشگاه علوم پزشکی ایلام و از طریق طرح مصوب در این دانشگاه تأمین شده بود که بدین‌وسیله از مسئولین مربوط تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

[1] Feasey N, Wansbrough-Jones M, Mabey DC, Solomon AW. Neglected tropical diseases. Br Med Bull 2010; 93: 179-200.

[2] World Health Organization. Geneva: WHO; 2010. Packages of Interventions. 2010.; Available at: http://www.who.int/whr/1996/media_centre/executive_summary1/en/index9.html

[3] Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. Int J Parasitol 2005; 35(11-12): 1169-80.

[4] World Health Organization. Leishmaniasis status for countries of the Eastern Mediterranien. 2012; Available at:

http://gis.emro.who.int/leishmanya/atlas.html

[5] Yaghoobi-Ershadi MR. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Iran and their role on Leishmania transmission. Journal of Arthropod-Borne Diseases 2012; 6(1): 1-17.

[6] Akhavan AA, Yaghoobi-Ershadi MR, Khamesipour A, Mirhendi H, Alimohammadian MH, Rassi Y, Arandian MH, Jafari R, Abdoli H, Shareghi N, Ghanei M, Jalali-zand N. Dynamics of Leishmania infection rates in Rhombomys opimus (Rodentia: Gerbillinae) population of an endemic focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. Bull Soc Pathol Exot 2010; 103(2): 84-9.

[7] Ahmadi NA, Modiri M, Mamdohi S. First survey of cutaneous leishmaniasis in Borujerd county, western Islamic Republic of Iran. East Mediterr Health J 2013; 19(10): 847-53.

[8] Maraghi S, Mardanshah O, Rafiei A, Samarbafzadeh A, Vazirianzadeh B. Identification of cutaneous leishmaniasis agents in four geographical regions of Khuzestan province using Nested PCR. Jundishapur Journal of Microbiology 2013; 6(4): e4866.

[9] Alimoradi S, Hajjaran H, Mohebali M, Mansouri F. Molecular identification of Leishmania species isolated from human cutaneous leishmaniasis by RAPD-PCR. Iranian Journal of Public Health 2009; 38(2): 44-50.

[10] Qader AM, Abood MK, Bakir TY. Identification of Leishmania parasites in clinical samples obtained from Cutaneous Leishmaniasis patients using PCR technique in Iraq. Iraqi Journal of Science 2009; 50(1): 32-6.

[11] Akhavan AA, Mirhendi H, Khamesipour A, Alimohammadian MH, Rassi Y, Bates P, Kamhawi S, Valenzuela JG, Arandian MH, Abdoli H, Jalali-zand N, Jafari R, Shareghi N, Ghanei M, Yaghoobi-Ershadi MR. Leishmania species: detection and identification by nested PCR assay from skin samples of rodent reservoirs. Exp Parasitol 2010; 126(4): 552-6.

[12] Yaghoobi-Ershadi MR, Hanafi-Bojd AA, Akhavan AA, Zahrai-Ramazani AR, Mohebali M. Epidemiological study in a new focus of cutaneous leishmaniosis due to Leishmania major in Ardestan town, central Iran. Acta Trop 2001; 79(2): 115-21.

[13] Oshaghi MA, Ravasan NM, Hide M, Javadian EA, Rassi Y, Sadraei J, Mohebali M, Sedaghat MM, Hajjaran H, Zarei Z, Mohtarami F. Phlebotomus perfiliewi transcaucasicus is circulating both Leishmania donovani and L. infantum in northwest Iran. Exp Parasitol 2009; 123(3): 218-25.

[14] Oshaghi MA, Ravasan NM, Hide M, Javadian EA, Rassi Y, Sedaghat MM, Mohebali M, Hajjaran H. Development of species-specific PCR and PCR-restriction fragment length polymorphism assays for L.infantum/ L.donovani discrimination. Exp Parasitol 2009; 122(1): 61-5.

[15] Oshaghi MA, Ravasan NM, Javadian EA, Mohebali M, Hajjaran H, Zare Z, Mohtarami F, Rassi Y. Vector incrimination of sand flies in the most important visceral leishmaniasis focus in Iran. Am J Trop Med Hyg 2009; 81(4): 572-7.

[16] Maleki-Ravasan N, Oshaghi MA, Hajikhani S, Saeidi Z, Akhavan AA, Gerami-Shoar M,

Shirazi MH, Yakhchali B, Rassi Y, Afshar D. Aerobic microbial community of insectary population of Phlebotomus papatasi. J Arthropod Borne Dis 2014; 8(1): 69-81.

[17] Motazedian MH, Karamian M, Ardehali S, Handjani F. Characterization of Leishmania parasites from archived geimsa-stained slides using nested polymerase chain reaction. Journal of Medical Research (JMR) 2004; 2(4): 1-9. (Persian)

[18] Saadati M, Nazarian S, Barati B, Mehdizadeh H, Shirzad H, Sadeghizadeh M, Mosapour A. Detection and identification of Leishmania parasites within sand flies using kDNA, rDNA and CPB loci Modares Journal Of Medical Sciences: Pathobiology 2008;11(1,2): 81-9.(persian)

[19] Kuhls K, Mauricio IL, Pratlong F, Presber W, Schönian G. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the Leishmania donovani complex. Microbes Infect 2005; 7(11-12): 1224-34.

[20] Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, Jaffe CL. PCR diagnosis and characterization of Leishmania in local and imported clinical samples. Diagn Microbiol Infect Dis 2003; 47(1): 349-58.

[21] Javadian E. Mohebali M. Momeni A. Leishmania parasite and leishmaniasis. 3th ed. Tehran: Markaz Nashre Daneshgahi 2008; p: 107-38. (Persian)

[22] Manual molecular procedures. Training course Molecular Epidemiology Leishmaniasis. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro Brazil. 2009; p: 53. Available at: http://clioc.fiocruz.br/documents/mmp.pdf

[23] 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.

[24] Mahmoudzadeh-Niknam H, Ajdary S, Riazi-Rad F, Mirzadegan E, Rezaeian A, Khaze V, Djadid ND, Alimohammadian MH. Molecular epidemiology of cutaneous leishmaniasis and heterogeneity of Leishmania major strains in Iran. Trop Med Int Health 2012; 17(11): 1335-44.

[25] Jahani M, Gharavi MJ, Shirzad HH. Passive Detection of Cutaneous Leishmaniasis in Police Personnel Deployed in the Provinces of Isfahan, Ilam, Bushehr, Khorasan and Khuzestan, Iran. Iranian Journal of Public Health 2003; 32(3): 23-7.

[26] Kassiri H, Sharifinia N, Jalilian M, Shemshad K. Epidemiological aspects of cutaneous leishmaniasis in Ilam province, west of Iran (2000–2007). Asian Pacific Journal of Tropical Disease 2012; 2(Suppl 1): S382-S6.

[27] Asgari Nezhad H, Borhani M, Norouzi M, Merzaie M. Cutaneous Leishmaniasis in school children in border area at southwest of Iran. Sci Parasitol 2012; 13(4): 153-8.

[28] World Health Organization. Control of the leishmaniases: Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22–26 March 2010. WHO Technical Report Series, no. 949. WHO, Geneva, Switzerland.2010; Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf