مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۷۵/هفته چهارم فروردین ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۲۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۲/۱۷

بررسی اپیدمیولوژی مولکولی سویه‌های کریتیدیا در شهر اصفهان و حومه

دکتر منیر دودی[۱]، دکتر محبوبه سترکی[۲]، دکتر گیلدا اسلامی[۳]، دکتر سید حسین حجازی[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: ژنوتایپینگ گونه‌های کریتیدیا، جهت انتخاب روش مناسب برای کنترل و پیشگیری از بیماری لیشمانیوز جلدی، تعیین بهتر اثر درمانی داروها و تهیه و ارزیابی واکسن با اهمیت است.

روش‌ها: در این مطالعه، به منظور تشخیص سویه‌های کریتیدیا از ۶۰۲ بیمار مبتلا به لیشمانیوز پوستی نوع مرطوب مراجعه کننده به مرکز تحقیقات پوست و سالک حضرت صدیقه‌ی طاهره (س) در اصفهان و سایر مراکز درمانی حومه‌ی اصفهان، نمونه‌گیری به عمل آمد. در مورد ۲۰۱ بیمار (۳۹/۳۳ درصد) ابتدا کشت در محیط NNN (Novy-Nicol-Mac Nea) و سپس استخراج DNA از پروماستیگوت‌ها به عمل آمد و سپس روش PCR-RFLP (Polymerase chain reaction -restriction fragment length polymorphism) اجرا شد و ناحیه‌ی ITS۱ (Internal transcribed spacer ۱) تکثیر و آنزیم HaeIII به کار گرفته شد.

یافته‌ها: دو گونه‌ی کریتیدیا به نام‌های کریتیدیا فاسیکولاتا ۲۷ مورد (۴۴/۱۳ درصد) و کریتیدیا لوسیلیا ۱۱ مورد (۴۷/۵ درصد) و بقیه تریپانوزماتیده با کد GQ۳۳۱۹۸۸ بودند که پس از آنالیز مولکولی، ۹۲ درصد شباهت با کریتیدیا فاسیکولاتا و ۸۹ درصد شباهت با کریتیدیا لوسیلیا نشان دادند و ۱۶۳ مورد (۰۹/۸۱ درصد) گزارش شدند. از ۳۵۱ بیمار (۳۱/۵۸ درصد) لیشمانیا جداسازی گردید و از ۵۰ بیمار (۳۱/۸ درصد) نه لیشمانیا و نه کریتیدیا جداسازی نشد. سپس نمونه‌ی کشت آن‌ها منفی گزارش گردید.

نتیجه‌گیری: در نهایت، نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که نه تنها کریتیدیا به عنوان آلوده کننده‌ی کشت‌های لیشمانیا در اصفهان و مناطق اطراف آن است؛ بلکه دارای پلی مورفیسم ژنتیکی نیز می‌باشد.

واژگان کلیدی: پلی‌مورفیسم، کریتیدیا، Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism، Internal transcribed spacer۱

ارجاع: دودی منیر، ستـــرکی محبوبه، اســـلامی گیلدا، حجازی سید حسین. **بررسی اپیدمیولوژی مولکولی سویه‌های کریتیدیا در شهر اصفهان و حومه.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۷۵): ۱۹۳-۱۸۲

مقدمه

تاژک‌داران خون و نسج گـروه وسـیعی از انگـل‌هـای تک یاخته‌ای را شامل می‌شوند که حداقل در یکـی از مراحل سیر تکاملی دارای تاژک می‌باشند. تـاژک‌داران خون و نسج دارای یک تا چهـار شـکل در چرخـه‌ی زنـدگی یـک تـک یاختـه مـی‌باشـند کـه عبـارت از پروماستیگوت یا لپتوموناد، اپی ماسـتیگوت یـا شـکل کریتیدیایی، تریپاماستیگوت یـا شـکل تریپـانوزومی و

۱- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، فلاورجان، اصفهان، ایران
۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ایذه، ایذه، ایران
۳- استادیار، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران
۴- دانشیار، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر منیر دودی
Email: doudi@iaufala.ac.ir

آماستیگوت یا لیشمان بادی می‌باشند (۱).

کریتیدیاها به صورت انگل حشرات مطرح می‌باشند؛ اما از آن جایی که در سکانس ژنی rRNA (Ribossomal RNA) بسیار نزدیک به لیشمانیاها می‌باشند، بسیاری از اوقات همراه با لیشمانیاها مطرح می‌شوند (۲). کریتیدیا اونکوپلتی (از یک حشره‌ی تغذیه کننده از یک شیره‌ی گیاه اونکوپلتوس فاشیاتوس و کریتیدیا دآنئی از یک حشره‌ی شکارگر به نام زئولوسلئوکوگراموس و کریتیدیا دسوزایی از یک مگس تغذیه کننده از شهد گل‌ها به نام اورینیدیا ابسا جداسازی شده‌اند (۵-۳). کریتیدیا لوسیلیا و کریتیدیا فاسیکولاتا از جمله کریتیدیاهایی می‌باشند که نه تنها انگل حشرات هستند؛ بلکه به عنوان عوامل آلوده کننده‌ی محیط‌های کشت لیشمانیا تلقی می‌شوند (۲).

در طی بیست سال گذشته، روش‌های متنوعی در جهت تعیین زیر گونه‌های مختلف لیشمانیا و کریتیدیا و مطالعه‌ی تنوع مولکولی و تأثیرات متقابل انگل و میزبان توسعه یافته است (۸-۶). شایان ذکر است که برای تمایز گونه‌های بسیار نزدیک به هم بایستی از روش‌هایی استفاده گردد که دارای خصوصیات زیر باشند:

عملی باشند، به سرعت انجام شوند، مقرون به صرفه باشند و نیاز به مهارت‌های ویژه نداشته باشند.

در سال‌های اخیر، روش‌های ژنتیکی و ملکولی متنوعی جهت تفکیک سویه‌های پاتوژن بیماری‌ها جایگاه ارزشمندی در مطالعات همه‌گیرشناسی و کلینیکی و سایر بیماری‌های عفونی یافته است. توسعه‌ی تکنیک‌های ملکولی با استفاده از نشانگرهای مولکولی و روش‌های مختلف PCR (Polymerase chain reaction) جهت تشخیص و تمایز فیلوژنتیک انگل‌ها گزارش شده است (۹). در دهه‌ی اخیر، بسیاری از نشانگرهای مولکولی مورد هدف واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) بوده‌اند؛ اما از بین این روش‌ها، آنالیز RFLP (Restriction fragment length polymorphism) مربوط به PCR سکانس‌های تکثیر شده‌ی ژن ITS (Internal transcribed spacer) نتایج امیدوار کننده‌ای را نشان داده است (۱۱-۹).

ژن ITS نسبت به ژن‌های rRNA در بین گونه‌ها کمتر محافظت شده است؛ به همین دلیل، برای بررسی فیلوژنی پلی مورفیسم و ارتباط ارگانیسم‌ها مناسب می‌باشد. در سال‌های اخیر با آنالیز سکانس ITS ارتباط فیلوژنی بسیاری از انگل‌ها را نشان داده‌اند (۱۳-۱۲). محققین معتقدند که ITS به اندازه‌ای است که می‌تواند تشخیص داخل گونه‌ای را نیز مشخص کند. (External transcribed spacer) ETS و ITS همراه با مناطقی که ۲۸S RNA و ۱۸S را کد می‌کنند، به مولکول پیشرو و rRNA تبدیل می‌شوند؛ اما به هر جهت ETS و ITS نسخه‌برداری شده، به طور سریع تجزیه می‌شوند و به نظر می‌رسد که هیچ گونه عملکردی ندارند (۱۵-۱۴).

همان‌طور که در قسمت بالا توضیح داده شد، آخرین قسمت ژن ریبوزومی قطعه‌ای از DNA است که از پروموتور تا انتهای ۳ منطقه‌ای که ۲۸S RNA را کد می‌کند، قرار دارد. این منطقه متشکل از SSU RNA (Smal subunit RNA)، ۵/۸S RNA و LSU RNA (Large subunit RNA) می‌باشد. این نواحی با مناطق ITS۱ و ITS۲ از هم فاصله می‌گیرند، نواحی غیر قابل نسخه‌برداری را NTS (None Transcribed Spacer) می‌گویند، هر دو

نـواحی ITS و NTS تغییـر پـذیری زیـادی را نشـان می‌دهند، اما ITS به دلیل اندازه‌ی به نسبت کـوچکش جالب است که در کنار قطعات به طور کامل حفاظت شده‌ای قرار دارد که پرایمرهای PCR را می‌توان برای آن‌ها طراحی کرد (۱۷-۱۶).

در این پـژوهش سـعی خواهـد شـد کـه اشـکال ژنوتایپی متفاوت کریتیدیا به کمک روش هـای PCR و RFLP به کمک تـوالی ژنـی ITS۱ مـورد بحـث و بررسی قرار گیرد و سپس اپیدمیولوژی مولکولی ایـن انگل در منطقه‌ی اصفهان و حومه ارایه گردد.

روش‌ها

بیماران و نواحی تحقیق

ایـن تحقیـق در شـهر اصـفهان و حومـه‌ی آن شـامل (سمت شمال: زینبیـه، برخـوار، میمـه، شـاهین شـهر، ملک‌شهر، دولت‌آباد، حبیب‌آباد، خـورزوق، دسـتجرد، زیارتگاه آقا علی عباس، امامزاده نرمی، گرگاب، نطنـز و بـادرود؛ سـمت جنـوب: سـپاهان‌شـهر، بهارسـتان، مبارکه، شهرضا، زرین شهر، دهاقان، سـمیرم و مـرغ و مهیـار؛ سـمت شـرق: هفتشـویه، جرقویـه، زیـار، خوراسگان، برآآن شـمالی، قهجاورسـتان، محمـدآباد، اشکاوند، گورت، جلگه، اژیه، ورزنه، انـرژی اتمـی و فرودگـاه شـهید بهشـتی؛ سـمت غـرب: لنجـان، خمینی شهر، نجف آباد، کوشک، فلاورجان، پیربکـران، اتوبان ذوب آهن، گلدشت، درچه، جوزدان، اصغرآباد و کهریزسنگ) واقع در مرکز ایران انجـام شـد و ۲۰۱ نمونه مورد بررسی قرار گرفـت. نمونـه‌گیـری از اول فروردین ماه ۱۳۹۰ تا پایان آبان ماه ۱۳۹۱ (به مدت ۸ ماه) انجام گرفت. زخم‌های لیشـمانیوز پوسـتی افـراد انتخاب شده دارای اشکال متفاوتی بودند.

جمع‌آوری نمونه و آماده‌سازی

زخم‌ها ابتدا با اسـتفاده از اتـانول ۷۰ درصـد و سـرم فیزیولوژی، استریل شدند و سپس از یـک بـی‌حسـی موضعی، محلول گزیلوکائین استفاده شد و با اسـتفاده از یک چاقوی جراحی استریل، برش‌های سـطحی بـه طول ۳-۲ میلی‌متر روی لبـه‌هـای زخـم ایجـاد شـد. سپس این برش‌های تهیه شده به محـیط کشـت مـایع (Brain heart infusion broth, Merk, Germany) BHI استریل در دمای ۴ °C و یا سرم فیزیولـوژی بـه عنوان محیط انتقالی وارد شد و سپس به محیط کشت (Novy Mac Neal Nicole, Merk, Germany) NNN در کنار شعله انتقال داده شد و در انکوبـاتوری با دمای ۲ ± ۲۴ °C قرار گرفت.

جداسازی و کشت نمونه‌ها

همان‌طـور کـه در انتهـای قسـمت قبـل اشـاره شـد، محیط‌های مـایع BHI حـاوی نمونـه نیـز در شـرایط استریل به محیط کشت دو فازی NNN جامد در کنار شعله منتقل و در دمـای ۲°C ± ۲۴ قـرار داده شـد و هر سه روز یک بار به مدت شش هفته قبل از این که منفی گزارش شود، مورد بررسی قرار گرفـت. سـپس پروماستیگوت‌های تکثیر شده به محـیط کشـت غنـی کننـده‌ی RPMI۱۶۴۰ (Roswell Park memorial institute, Merk, Germany) همـراه بـا ۱۰ درصـد FCS (Fetal calf serum, Sigma ,America) منتقـل و تکثیر گردید. سپس نمونه‌های جداسازی شده در اواخـر مرحلـه‌ی لگـاریتمی رشـد (۵×۱۰^{۶} parasites/ml) برداشت شد و با محلـول نمکـی بـافر فسـفات PBS (Phosphate buffered saline, Sigma, America) استریل با pH معادل ۷/۴ سانتریفیوژ و شسته شدند و سپس در فریزر ۷۰ °C-، جهت آزمایش‌هـای بعـدی

قرار داده شد. گونه‌های مرجع مورد استفاده در این تحقیق کریتیدیا فاسیکولاتا و کریتیدیا لوسیلیای استاندارد بودندکه از دانشکده‌ی بهداشت دانشگاه تهران خریداری شدند.

استخراج DNA

سوسپانسیون پروماستیگوت‌های دو ایزوله‌ی لیشمانیا و کریتیدیای شستشو شده در مرحله‌ی قبل حاوی (۵×۱۰^۶ parasites/ml) از فریزر ۷۰- °C خارج و به رسوب آن ۲۰۰ میکرولیتر Binding buffer و ۴۰ میکرولیتر پروتئیناز K اضافه شد و محتویات به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری ۷۰ °C قرار داده شد. سایر مراحل مطابق دستورات کیت (Roche, USA, ۷۹۶۸۲۸۰۰۱ ۱۱. Hihg pure PCR template preparation kit, Cat.NO) انجام شد و در نهایت، DNA در ۲۰۰ میکرولیتر Elution buffer حل شد. DNA استخراج شده از نظر کمی و کیفی به ترتیب ابتدا به وسیله‌ی اسپکتروفتومتر و سپس با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد در بافر TBE۱X (Tris borate EDTA, Sigma, America) مورد ارزیابی قرار گرفت.

تکثیر ناحیه‌ی ITS۱ به روش PCR

جهت تکثیر ناحیه‌ی ITS۱ به روش PCR، از پرایمرهای ارایه شده در جدول ۱ استفاده شد.

با استفاده از سویه های استاندارد بهترین شرایط جهت انجام PCR تعیین شد. واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. ابتدا Master mix تهیه شد که شامل Taq polymerase به میزان ۲/۰ میکرولیتر، $MgCl_2$ (۵۰ mM) به میزان ۲ میکرولیتر، پرایمرهای R (Reverse) و F (Forward) با غلظت ۱۰ پیکومول از هر کدام ۱ میکرولیتر، بافر PCR۱۰x به میزان ۲ میکرولیتر، (Deoxynucleotide triphosphates) DNTPs (۱۰ mM) به میزان ۱ میکرولیتر و در نهایت به موارد پیش‌گفته نمونه‌ی DNA استخراج شده به میزان ۱ میکرولیتر اضافه و حجم نهایی با آب مقطر استریل به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. مطابق جدول ۲ نمونه‌ها داخل دستگاه ترموسایکلر (Corbet, Australia) قرار گرفت و سیکل‌های زیر جهت انجام PCR برنامه‌ریزی شد (جدول ۳).سپس محصولات PCR به همراه کنترل مثبت و منفی در کنار نشانگر مولکولی ۵۰ bp و بر روی ژل آگارز ۵/۱ درصد حاوی ۷/۰ µg/ml اتیدیوم بروماید به ازای هر میلی‌لیتر ژل در بافر TBE ۱X قرار داده شد و سپس تحت ولتاژ ۸۰ ولت به مدت ۴۵-۲۵ دقیقه الکتروفورز گردید و در نهایت، محصولات PCR در دستگاه ترانس لومیناتور با استفاده از لامپ UV (Ultraviolet) مشاهده شد.

تحلیل RFLP جهت ITS۱ تقویت شده

برای تعیین گونه‌ی محصولات ITS۱-PCR تحت تأثیر آنزیم محدود کننده‌ی HaeIII (Fermentase, Germany) و بافر مربوط در دمای ۳۷ °C به مدت ۲ ساعت هضم شدند و بر روی ژل آگارز ۲ درصد در بافر TBE ۱X تحت تأثیر ولتاژ ۸۰ ولت به

جدول ۱. توالی پرایمرهای L۵/۸s و LITSr (۱۳، ۲)

طول (باز)	توالی (´۳ → ´۵)	عنوان	پرایمر
۱۸	CTGGATCATTTTCCGATG	LITSr	Forward (F)
۲۰	TGATACCACTTATCGCACTT	L۵/۸s	Reverse (R)

جدول ۲. دستورالعمل بهینه شده برای انجام واکنش **Polymerase chain reaction**

	مواد	غلظت اولیه	غلظت نهایی	حجم
۱	بافر PCR	۱۰X	۱X	۲ µL
۲	$MgCl_2$	۵۰ mM	۱/۵ mM	۲ µL
۳	DNTP mixed	۱۰ mM	۰/۲ mM	۱ µL
۴	پرایمرها (F + R)	۱۰۰ Pmol/µL	۱۰ Pmol/µL	۲ µL
۵	DNA template	–	۱۰۰ ng	۱ (۱-۵) µL
۶	پلیمراز Taq	۵ U/ml	۱/۲ U/ml	۰/۲ µL
۷	آب مقطر استریل	–	–	بالای ۱۶/۸ µL
	حجم کل	–	–	۲۵ µL

PCR: **Polymerase chain reaction**; DNTP: Deoxynucleotide triphosphate

جدول ۳. سیکل حرارتی استفاده شده جهت تکثیر قطعه‌ی مورد نظر در روش **Polymerase chain reaction**

مراحل	دما	زمان	سیکل
Initial denaturation	۹۵ °C	۵ دقیقه	۱ سیکل
Denaturation	۹۵ °C	۲۰ ثانیه	
Annealing	۵۳ °C	۳۰ثانیه	۳۰ سیکل
Extention	۷۲ °C	۱ دقیقه	
Post extentiom	۷۲ °C	۳ دقیقه	۳۰ سیکل

جدول ۴. لیست آنزیم‌های مورد استفاده در این پژوهش

Restriction Endonuclease	Protype	Recognation Sequence/Cleavage Site	Product No.
HaeIII (BsuRI)	BsnI	GG ↓CC	RV۱۱۸۲
ScrfI	BmrFI	CC ↓ NGG	RV۱۱۵۴
TaqI	TaqI	T ↓CGA	RE۱۳۴۶
DdeI	BstDEI	C ↓TNAG	RE۱۲۱۲

مدت ۱ ساعت الکتروفورز شدند و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. سپس جهت تعیین سویه‌های کریتیدیا محصولات ITS۱-PCR تحت تأثیر آنزیم‌های ScrfI، TaqI و DdeI (جدول ۴) قرار گرفتند که این آنزیم ها به کمک برنامه‌ی Restrictionmap موجود در EBI (European bioinformatics institute) بر اساس ژنوم انتخاب شدند و ازشرکت سیناکلون خریداری گردیدند (۱۸).

تعیین توالی DNA

برای تعیین توالی DNA از محصولات PCR که تحت تأثیر چهار آنزیم DdeI، TaqI، ScrfI و HaeIII برش‌های متفاوت با گونه‌ی استاندارد را نشان داده بودند، استفاده شد. این نمونه‌ها به شرکت فزاپژوه تهران ارسال شد و خوانش آن توسط کشور کره صورت گرفت. سپس نتایج به کمک نرم افزار Blast مورد تجزیه و تحلیل مولکولی قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

جهت آنالیز آماری توزیع فراوانی سویه‌های کریتیدیا در منطقه‌ی اصفهان و حومه از آزمون χ^2 استفاده شد. $P < ۰/۰۰۱$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

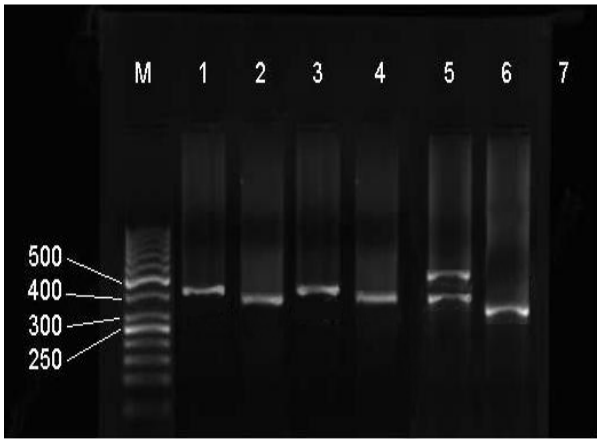
در این تحقیق که در طی ۸ ماه انجام شد، از ۶۰۲ بیمار دارای لیشمانیوز پوستی نوع مرطوب مراجعه کننده به مرکز تحقیقات پوست و سالک اصفهان و سایر مراکز درمانی حومه‌ی اصفهان، نمونه‌گیری به عمل آمد. از ۲۰۱ بیمار (۳۳/۳۹ درصد) پس از کشت در محیط NNN و استخراج DNA از پروماستیگوت‌ها و اجرای روش PCR-RFLP (Polymerase chain reaction -restriction fragment length polymorphism) و تکثیر ناحیه‌ی ITS۱ و به کار بردن آنزیم HaeIII، دو گونه‌ی کریتیدیا به نام‌های کریتیدیا فاسیکولاتا ۲۷ مورد (۱۳/۴۴ درصد) و کریتیدیا لوسیلیا ۱۱ مورد (۵/۴۷ درصد) و بقیه تریپانوزماتیده با کد GQ۳۳۱۹۸۸ بودند که پس از آنالیز مولکولی، ۹۲ درصد شباهت با کریتیدیا فاسیکولاتا و ۸۹ درصد شباهت با کریتیدیا لوسیلیا نشان دادند و ۱۶۳ مورد (۸۱/۰۹ درصد) گزارش شدند.

از ۳۵۱ بیمار (۵۸/۳۱ درصد) انگل لیشمانیا جداسازی گردید و از ۵۰ بیمار (۸/۳۱ درصد) نه انگل لیشمانیا و نه کریتیدیا جداسازی نشد. سپس نمونه‌ی کشت آن‌ها منفی گزارش شد. در نهایت، نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که ۲۰۱ بیمار در این مناطق مورد بررسی قرار گرفتند که ۱۰۳ نمونه (۵۱/۲۴ درصد) مربوط به منطقه‌ی اصفهان و ۹۸ نمونه (۴۸/۷۶ درصد) مربوط به مناطق اطراف اصفهان بودند (جدول ۳).

از مقایسه‌ی نتایج به دست آمده، می‌توان چنین استنباط نمود که تریپانوزماتیده با کد GQ۳۳۱۹۸۸ نسبت به دو گونه ی دیگر کریتیدیا بیشترین فراوانی (۱۶۳ مورد یا ۸۱/۰۹ درصد) را به عنوان آلوده کننده‌ی محیط کشت داشت.

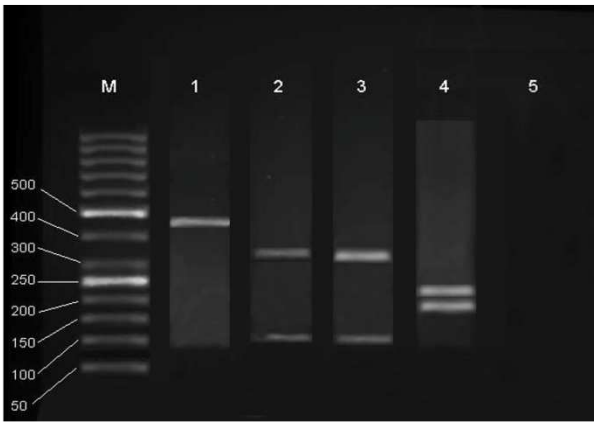
نتایج PCR-RFLP ایزوله‌ها در اصفهان و حومه با آنزیم برش دهنده‌ی HaeIII نشان داد که تعدادی از ایزوله‌ها تک باند ۳۵۰ bp را نشان دادند و مربوط به جنس لیشمانیا بودند. تعدادی هیچ باندی (نه لیشمانیا و نه کریتیدیا) را ظاهر نکردند و تعدادی تک باند bp ۴۰۰ را آشکار کردند. در تعدادی دیگر از ایزوله‌ها، تک باند ۴۵۰ bp و در تعداد زیادی از ایزوله‌ها، دو باند ۴۵۰ bp و ۴۰۰ مشاهده شد که سه گروه اخیر مربوط به خانواده‌ی تریپانوزوماتیده بودند (شکل ۱).

این در حالی است که در برش آنزیمی سه گروه اخیر که مربوط به خانواده‌ی تریپانوزوماتیده بودند، پس از برش با سایر آنزیم‌ها ScrfI (DdeI و TaqI) هیچ گونه تفاوتی نسبت به نمونه‌های استاندارد مشاهده نشد (شکل‌های ۲، ۳ و ۴).

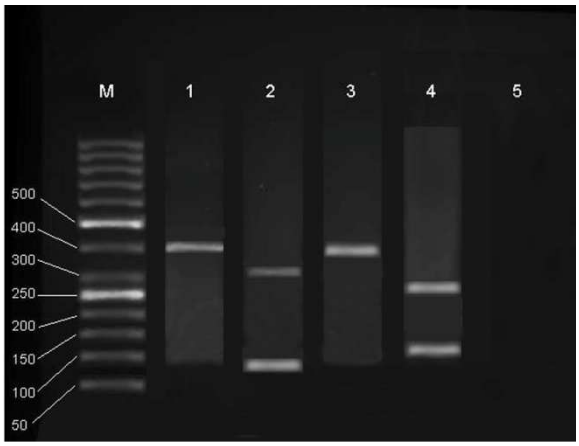


شکل ۱. پروفایل‌های باندی ایجاد شده از ژنوم ایزوله‌ها به روش PCR-RFLP با آنزیم HaeIII

M: نشانگر مولکولی bp ۵۰، خط ۱: استاندارد C. fasciculata، خط ۲: استاندارد C. luciliae، خط ۳: ایزوله‌ی منطبق با C. fasciculata، خط ۴: ایزوله‌ی منطبق با C. luciliae، خط ۵: ایزوله‌ی غیر منطبق با دو نمونه‌ی استاندارد C. luciliae و C. fasciculata، خط ۶: جنس لیشمانیا، خط ۷: شاهد منفی.

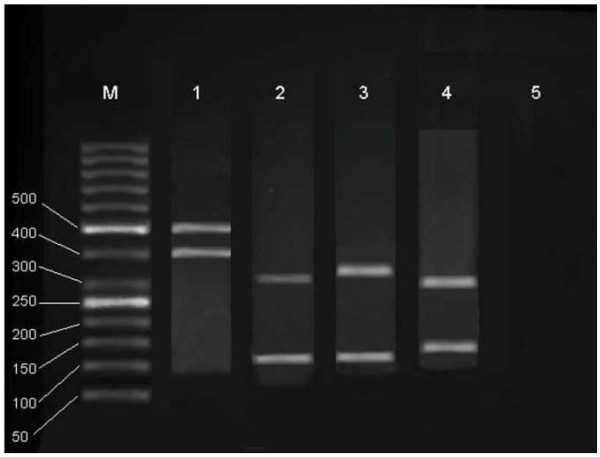


شکل ۲. پروفایل‌های باندی ایجاد شده از ژنوم نمونه‌های منطبق با (C. fasciculate ۴۵۰ bp) به روش PCR-RFLP با آنزیم‌های ScrfI، DdeI و TaqI. M: نشانگر مولکولی ۵۰ bp، خط ۱: نمونه‌ی استاندارد C. fasciculate، خط ۲: پروفایل‌های باندی ایجاد شده توسط آنزیم DdeI، خط ۳: پروفایل‌های باندی ایجاد شده توسط آنزیم ScrfI، خط ۵: شاهد منفی



شکل ۳. پروفایل‌های باندی ایجاد شده از ژنوم نمونه‌های منطبق با C. luciliae (۴۰۰ bp) به روش PCR-RFLP با آنزیم‌های ScrfI، DdeI و TaqI. M: نشانگر مولکولی ۵۰ bp، خط ۱: نمونه‌ی استاندارد C. luciliae، خط ۲: پروفایل‌های باندی ایجاد شده توسط آنزیم DdeI، خط ۳: پروفایل‌های باندی ایجاد شده توسط آنزیم ScrfI، خط ۴: پروفایل‌های باندی ایجاد شده توسط آنزیم TaqI، خط ۵: شاهد منفی.

جهت تایپینگ ایزوله‌های تریپانوزوماتیده که پروفایل‌های آنزیمی آن‌ها برشی غیر مطابق با گونه‌ی استاندارد را نشان داده بود، این نمونه‌ها جهت سکانس به شرکت فزاپژوه در تهران ارسال شدند. سپس توسط کشور کره تعیین توالی گردیدند. نتایج مربوط در شکل‌های ۵، ۶ و ۷ ارایه شده است.



شکل ۴. پروفایل‌های باندی ایجاد شده از ژنوم غیر منطبق با استانداردهای C. luciliae و C. fasciculate (۴۵۰ bp و ۴۰۰). M: نشانگر مولکولی ۵۰ bp، خط ۱: نمونه‌ی غیر منطبق با استانداردهای C. luciliae و C.fasciculate، خط ۲: پروفایل‌های باندی ایجاد شده توسط آنزیم DdeI، خط ۳: پروفایل‌های باندی ایجاد شده توسط آنزیم ScrfI، خط ۴: پروفایل‌های باندی ایجاد شده توسط آنزیم TaqI، خط ۵: شاهد منفی.

بحث

مطابق با استراتژی‌های کنترل بیماری لیشمانیوز جلدی در مناطق هایپر آندمیک ایران و تهیه‌ی واکسن جهت کنترل بیماری که از طرف سازمان جهانی بهداشت نیز ارایه شده است (۱۶)، یکی از ضرورت‌های اساسی، تعیین ویژگی‌های گونه‌های جنس کریتیدیا می‌باشد که متأسفانه باعث آلوده کردن کشت‌های انگلی لیشمانیا می‌شود و مانع از تهیه‌ی آنتی ژن خالص از این انگل (جنس لیشمانیا) جهت تهیه‌ی واکسن می‌گردد (۱۷). Marmur و همکاران اذعان داشتند که کریتیدیا می‌تواند پروتوزوئری باشد

TTTCTCTCTCAACTCTCTCTCTTGTTGGGGGTGTTGTGTGTGGGGGTTTGTGCGCGCGG
TGCCGGAACAAG GCCAATCGATGCACGTGTGTGTATTGTATTGTTCTTTCTT

شکل ۵. نتایج به دست آمده از ترتیب‌یابی محصول جایگاه ژنی ITS۱ در ایزوله‌های منطبق با گونه‌ی استاندارد C. fasciculate (Accession Number emb | Y۰۰۵۵/۱ |)

TTTCTCTCTCAACTCTCTCTCTTGTTGGGGGTGTTGTGTGTGGGGGTTTGTGCGCGCGG
TGCCGGAACAAG GCCAATCGATGCACGTGTGTGTATTGTATTGTTCTTTCTT

شکل ۶. نتایج به دست آمده از ترتیب‌یابی محصول جایگاه ژنی در ایزوله‌های منطبق با گونه‌ی استاندارد C.luciliae ITS۱ (Accession Number emb | AJ۶۲۷۰۱۸/۱ |)

TTTCTCTCTCAACTCTCTCTTTTGTTGGGGGTGTTGTGTGTGGGGGTTTGTGCGCGCGGT
GCCGGAACAAG GCCAATCGATGCACGTGTGTGTATTGTATTGTTCTTTCTT

شکل ۷. نتایج به دست آمده از ترتیب‌یابی محصول جایگاه ژنی در گونه‌ای از تریپانوزوماتیده منطبق با Accession number GQ۳۳۱۹۸۸

جدول ۵. توزیع فراوانی خانواده‌ی *تریپانوزوماتیده‌ی* جداسازی شده از کشت بیماران در دو منطقه‌ی اصفهان و حومه

جنس و گونه‌ی انگل	منطقه: اصفهان تعداد (درصد)	حومه‌ی اصفهان تعداد (درصد)	کل تعداد (درصد)
تریپانوزوماتیده‌ای با Accession number GQ۳۳۱۹۸۸	۸۰ (۷۷/۶۶)	۸۳ (۸۴/۶۹)	۱۶۳ (۸۱/۰۹)
Crithidia fasciculata	۱۷ (۱۶/۵۰)	۱۰ (۱۰/۲۰)	۲۷ (۱۳/۴۴)
Crithidia luciliae	۶ (۵/۸۲)	۵ (۵/۱۱)	۱۱ (۵/۴۷)
جمع	۱۰۳ (۵۱/۲۴)	۹۸ (۴۸/۷۶)	۲۰۱ (۱۰۰)

(P < ۰/۰۰۱)

که به صورت اندوسمبیوز در داخل بعضی از باکتری‌ها مانند بوردتلا برونچی سپتیکا به سر می‌برد. همچنین این محققان بیان داشتند که این انگل علاوه بر باکتری پیش‌گفته، قادر است به صورت همزیست در داخل بوردتلا کولیسیس نیز زندگی نماید. این محقق نتایج پژوهش‌های خود را با بررسی ژن‌های ریبوزومی rRNA و منطقه‌ی SSURNA یعنی قسمتی از ژن ITS۱ اثبات نموده است (۴).

Mundim و همکاران بیان داشتند که نه تنها کریتیدیاها را می‌توان از باکتری‌هایی مانند بوردتلا برونچی سپتیکا و بوردتلا یولیسیس به صورت اندو سمبیونت جداسازی نمود؛ بلکه می‌توان آن‌ها را از یک پشه به نام آئیدس و کسانس به خصوص کریتیدیا اونکوپلتی از یک حشره‌ی تغذیه کننده از یک شیره‌ی گیاهی (احتمالا اونکوپلتوس فاسیاتوس) جداسازی نمود و کریتیدیایی به نام کریتیدیا دآنئی از یک حشره‌ی شکارگر به نام زئولوسلئوکوگراموس و کریتیدیایی به نام کریتیدیا دسوزایی از یک مگس تغذیه کننده از شهد گل‌ها به نام اورنیدیا اوبس جداسازی نمود. این محققان اذعان می‌دارند که ارتباطی بین این تک یاخته‌ها با گروه

بزرگی از حشرات مربوط به خانواده‌های دیپتران و همیتران، سبب شگفتی‌های زیادی در مورد این تک یاخته شده است (۵).

de Souza و همکاران بیان داشتند که کریتیدیاها قادرند در داخل برخی از انگل‌ها مربوط به خانواده‌ی تریپانوزماتیده، زیر خانواده‌ی لیشمانیاها به صورت اندوسمبیوز به سر برند و همراه با آن‌ها، به میزبان‌های مختلف منتقل شوند. این محقق بهترین تفکیک کریتیدیاها از لیشمانیاها را جداسازی ژن‌های KDNA و یا rRNA آن‌ها دانست و بیان نمود که با استخراج DNA کینتو پلاستی و یا DNA ریبوزومی و سپس تکثیر آن به کمک PCR و در نهایت با استفاده از تکنیک PCR-RFLP و با کمک آنزیم HaeIII و جداسازی باند ۳۵۰ bp برای لیشمانیاها و باند ۴۵۰ bp برای کریتیدیاها، می‌توان این انگل را از خانواده‌ی تریپانوزوماتیده تفکیک نمود (۱۹).

نتایج مطالعه‌ی حاضر نیز تا حدودی با نتایج de Souza و همکاران هماهنگی و مطابقت دارد؛ زیرا بر اساس جدول ۵ که توزیع فراوانی خانواده‌ی تریپانوزوماتیده‌ی جداسازی شده از کشت بیماران دارای لیشمانیوز جلدی در دو منطقه‌ی اصفهان و حومه را نشان می‌دهد، تعداد زیادی از نمونه‌ها (۱۶۳ نمونه یا ۸۱/۰۹ درصد) پس از PCR و با استفاده از آنزیم HaeIII دو باند ۴۵۰ bp و ۴۰۰ را نشان دادند که پس از توالی‌یابی چند نمونه به صورت اتفاقی، نتایج آنالیز مولکولی با نرم‌افزار Blast، ۹۲ درصد مشابهت *با* کریتیدیا فاسیکولاتا و ۸۹ درصد مشابهت با کریتیدیا لوسیلیا را نشان داد و توالی این ژن در بانک جهانی ژن *با* کد GQ۳۳۱۹۸۸ مطابقت داشت که توسط دودی و همکاران بیان شده بود (۲).

Berzunza-Cruz و همکاران نشان دادند که هتروژنیسیتی زیادی را به کمک روش PCR-RFLP می‌توان بین سویه‌های مختلف لیشمانیا و خانواده‌ی مربوط به آن‌ها یعنی خانواده‌ی تریپانوزوماتیده پیدا کرد و گونه‌های مختلف، تفاوت‌های مختلفی را نشان می‌دهند (۱۰). در پژوهش حاضر نیز با استفاده از روش مولکولی PCR-RFLP و به کار بردن آنزیم HaeIII مطابق شکل ۱ و پروفایل‌های باندی ایجاد شده از ژنوم ایزوله‌ها، مشاهده شد که بر حسب تفاوت توالی ناحیه‌ی رونوشت‌برداری ITS۱ بین گونه‌های مختلف کریتیدیا، تفاوت وجود دارد؛ به طوری که تمام ایزوله‌هایی که پس از PCR و به کار بردن آنزیم HaeIII، باند ۴۵۰ bp را آشکار کرده بودند، از نظر توالی ژنی ITS۱ مشابه کریتیدیا فاسیکولاتا و تمامی ایزوله‌هایی که پس از PCR و به کار بردن آنزیم HaeIII باند ۴۰۰ bp را آشکار کرده بودند، از نظر توالی ژنی ITS۱ مشابه کریتیدیا لوسیلیا بودند.

Yangو همکاران بیان نمودند که همانند بیشتر انگل‌ها، بررسی روابط فیلوژنتیک جنس‌های مختلف انگل لیشمانیا و انگل کریتیدیا خیلی پیچیده است؛ زیرا تعریف و مرزبندی زیرگونه‌ها برای توصیف آن‌ها بسیار مشکل است. آنان ۱۷ ایزوله‌ی لیشمانیا و ۲ ایزوله‌ی کریتیدیا را از مناطق مختلف کشور چین جمع‌آوری نمودند و با به کار بردن تکنیک PCR ژن ریبوزومی ITS۱ را تکثیر نمودند. سپس با توالی‌یابی تعدادی از ایزوله‌ها نه تنها به تاکسونومی آن‌ها اقدام نمودند، بلکه قرابت‌های فیلوژنتیک بین گونه‌های لیشمانیا و سایر انگل‌ها را نیز مشخص کردند (۲۰). البته شایان ذکر است که در جریان استفاده از آنزیم‌های ScrfI، DdeI و TaqI بر روی تمامی

ایزوله‌ها در مقایسه با نمونه‌های استاندارد، هیچ گونه تفاوتی در شکست پروفایل‌های باندی مشاهده نشد. چنین به نظر می‌آید که آنزیم HaeIII در این پژوهش برای تفکیک گونه‌های کریتیدیا نقش کلیدی بازی کرده است.

نتیجه‌گیری

به طور کلی، از نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر می‌توان چنین استنتاج نمود که جنس کریتیدیا به عنوان آلوده کننده‌ی کشت‌های لیشمانیا که برای اولین بار در کشور ایران و در منطقه‌ی اصفهان مورد بررسی قرار گرفت، دارای پلی مورفیسم ژنتیکی است و این نتایج نشان می‌دهد که اپیدمیولوژی مولکولی این آلوده کننده، ارتباط مستقیمی با الگوهای PCR-RFLP دارد؛ اما از نظر ارتباط این الگوها با سایر مناطق جغرافیایی کشور ایران که برای انگل لیشمانیا به خصوص لیشمانیاماژور جزء مناطق هایپر آندمیک هستند، بایستی تحقیق و تفحص بیشتری صورت گیرد. نتایج حاصل از این تحقیق می‌تواند مورد استفاده‌ی پزشکان به خصوص متخصصین پوست برای درمان صحیح بیماری لیشمانیوز پوستی قرار گیرد و راه‌گشای مسیری جهت تهیه‌ی واکسن لیشمانیوز پوستی باشد.

تشکر و قدردانی

از مسؤولین محترم مراکز تحقیقاتی پوست و سالک حضرت صدیقه‌ی طاهره (س) اصفهان و آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان به ویژه سرکار خانم مهندس شادی شاهسار تشکر و قدردانی می‌گردد. این مقاله برگرفته از طرح پژوهشی به شماره‌ی ۳۰۱/۲۸۲۰۵ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان می‌باشد و به کمک حمایت مالی این دانشگاه انجام شد.

References

1. World Health Organization. Control of the leishmaniases [Online]. [cited 2010 Mar 22]; Available from: URL: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf
2. Doudi M, Hejazi SH, Razavi MR, Narimani M, Khanjani S, Eslami G. Comparative molecular epidemiology of Leishmania major and Leishmania tropica by PCR-RFLP technique in hyper endemic cities of Isfahan and Bam, Iran. Med Sci Monit 2010; 16(11): CR530-CR535.
3. Garrity G, Brenner DJ, Staley JT, Krieg NR, Boone DR, De Vos P, et al. Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology. New York, NY: Springer; 2006. p. 795-836.
4. Marmur J, Cahoon ME, Shimura Y, Vogel HJ. Deoxyribonucleic Acid Type attributable to a Bacterial Endosymbiote in the Protozoon Crithidia (Strigomonas) oncopelti. Nature 1963; 197: 1228-9.
5. Mundim MH, Roitman I, Hermans MA, Kitajima EW. Simple nutrition of Crithidia deanei, a reduviid trypanosomatid with an endosymbiont. J Protozool 1974; 21(4): 518-21.
6. Baker JR, Muller R, Rollinson D. Advances in Parasitology. London, UK: Academic Press; 1998. p. 215-40.
7. Bailey MS, Lockwood DNJ. Cutaneous leishmaniasis. Clinics in Dermatology 2007; 25(2): 203-11.
8. Banuls AL, Brisse S, Sidibe I, Noel S, Tibayrenc M. A phylogenetic analysis by multilocus enzyme electrophoresis and multiprimer random amplified polymorphic DNA fingerprinting of the Leishmania genome project Friedlin reference strain. Folia Parasitol (Praha) 1999; 46(1): 10-4.
9. El Tai NO. Molecular approaches to direct diagnosis and characterization of Leishmania donovani [Thesis]. Berlin, Germany: Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I, Der Humboldt-Universität zu Berlin 2002.
10. Berzunza-Cruz M, Cabrera N, Crippa-Rossi M, Sosa CT, Perez-Montfort R, Becker I.

Polymorphism analysis of the internal transcribed spacer and small subunit of ribosomal RNA genes of Leishmania mexicana. Parasitol Res 2002; 88(10): 918-25.
11. Du Y, Chang KP. PCR amplification and sequence analysis of pre-ribosomal RNA genes from Crithidia endosymbionts, p. 499-504. In: Sato S, Ishida M, Ishikawa H, editors. Endocytobiology. Tiubingen, Germany: Tubingen University Press; 1993.
12. Tashakori M, Kuhls K, Al-Jawabreh A, Mauricio IL, Schonian G, Farajnia S, et al. Leishmania major: genetic heterogeneity of Iranian isolates by single-strand conformation polymorphism and sequence analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer. Acta Trop 2006; 98(1): 52-8.
13. Kazemi-Rad E, Mohebali M, Hajjaran H, Rezaei S, Mamishi S. Diagnosis and Characterization of Leishmania Species in Giemsa-Stained slides by PCR-RFLP. Iranian J Publ Health, 2008; 37(1): 54-60.
14. Schonian G, Akuffo H, Lewin S, Maasho K, Nylen S, Pratlong F, et al. Genetic variability within the species Leishmania aethiopica does not correlate with clinical variations of cutaneous leishmaniasis. Mol Biochem Parasitol 2000; 106(2): 239-48.
15. Schonian G, Schnur L, El Fari FM, Oskam L, Kolesnikov AA, Sokolowska-Kohler W, et al. Genetic heterogeneity in the species Leishmania tropica revealed by different PCR-based methods. Trans R Soc Trop Med Hyg 2001; 95(2): 217-24.
16. Cupolillo E, Momen H, Grimaldi G, Jr. Genetic diversity in natural populations of New World Leishmania. Mem Inst Oswaldo Cruz 1998; 93(5): 663-8.
17. Schonian 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): 349-58.
18. Wang JR, Lee ST, Juan WH, Chuang WL, Hung SI, Chung WH, et al. Indigenous leishmaniasis in Taiwan: report of a case. Int J Dermatol 2008; 47(1): 40-3.
19. de Souza W, Motta MC. Endosymbiosis in protozoa of the Trypanosomatidae family. FEMS Microbiol Lett 1999; 173(1): 1-8.
20. Yang BB, Guo XG, Hu XS, Zhang JG, Liao L, Chen DL, et al. Species discrimination and phylogenetic inference of 17 Chinese Leishmania isolates based on internal transcribed spacer 1 (ITS1) sequences. Parasitol Res 2010; 107(5): 1049-65.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 11.01.2014
Vol. 32, No. 275, 4th Week, April 2014
Accepted: 08.03.2014

The Molecular Epidemiology of *Crithidia* Strains in Isfahan City and Surrounding Areas, Iran

Monir Doudi PhD[1], Mahbubeh Setorki PhD[2], Gilda Eslami PhD[3], Seyed Hossein Hejazi PhD[4]

Original Article

Abstract

Background: Genotyping of *Crithidia* species is of high importance in the selection of an appropriate method to control and prevent cutaneous leishmaniasis (CL), determination of the best therapeutic effect of drugs, and preparation and evaluation of the vaccines.

Methods: In order to identify the strains of *Crithidia*, sampling was done in one of the endemic regions of wet or rural type zoonotic cutaneous leishmaniasis (ZCL) in Isfahan city and surrounding areas, Iran. Samples were 602 patients with wet cutaneous leishmaniasis referred to Isfahan Leishmaniasis Research Center or other health centers in the vicinity of Isfahan. Sampling in Novy-MacNeal-Nicolle medium (NNN) medium, extraction of DNA from promastigotes, implementation of the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method, amplification of internal transcribed spacer (ITS1), and application of HaeIII enzyme were performed.

Findings: 201 patients (33.39%) were found with two species of *Crithidia*, 27 cases of *Crithidia fasciculata* (13.44%) and 11 cases of *Crithidia luciliae* (5.47%). The rest of the cases, however, were *trypanosomatidae* with accession number *of GQ331988*; molecular analysis showed 92% had tendency of homology with *Crithidia fasciculata* and 89% with *Crithidia luciliae* (163 cases or 81.9%). Out of 351 patients (58.31%), leishmaniasis parasite was isolated, and out of 50 patients (8.31%), neither *Leishmania* nor *Crithidia* were isolated; therefore, their report was negative following cultured samples.

Conclusion: The results of the present study suggested that *Crithidia* not only contaminates *leishmania* culture but also enjoys genetic polymorphism in Isfahan and surrounding areas.

Keywords: Polymorphism, *Crithidia*, Internal transcribed spacer (ITS1), Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)

Citation: Doudi M**,** Setorki M, Eslami G, Hejazi SH. **The Molecular Epidemiology of *Crithidia* Strains in Isfahan City and Surrounding Areas, Iran.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(275): 182-93

1- Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Biology, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Isfahan, Iran
2- Assistant Professor, Department of Biology, School of Basic Sciences, Islamic Azad University, Izeh Branch, Izeh, Iran
3- Assistant Professor Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
4- Associate Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Monir Doudi PhD, Email: doudi@iaufala.ac.ir