

بررسی خصوصیت مولکولی ایزوله‌های بالینی *Leishmania Major* دارای ناحیه *ITS1* مشابه با گونه‌های *Crithidia*

مینا آقائی میبیدی^۱، گیلدا اسلامی^۲، مسعود توحیدفر^۳، علی فتاحی بافقی^۴، سعیده‌السادات حسینی^۵، سلمان احمدیان^۱، مراد اللومی^۶

مقاله کوتاه

چکیده

مقدمه: لیشمانیوز توسط تک‌یاخته‌ای از جنس *Leishmania* ایجاد می‌شود. تعدادی از ایزوله‌های این انگل در مناطقی از ایران دارای الگوی متفاوتی از *ITS1* و مشابه انواع گونه‌های *Crithidia* هستند. بنابراین، در این مطالعه به بررسی مولکولی این ایزوله‌ها پرداخته شد.

روش‌ها: از ایزوله‌های دارای *ITS1* مشابه با انواع گونه‌های *Crithidia*، DNA ژنومی استخراج شد. تکثیر با استفاده از پرایمر اختصاصی 13A/13B صورت گرفت و در ادامه، توالی‌یابی شد. توالی‌های دریافتی از طریق BLASTn و Multiple alignment و T-Coffee و Vector NTI مورد بررسی قرار گرفت. جهت گروه‌بندی و بررسی وضعیت ایزوله‌ها، از درخت فیلوژنی استفاده گردید.

یافته‌ها: بررسی توالی‌های به دست آمده، مشخص نمود که هتروژنیسیته کمی بین ایزوله‌های مورد بررسی وجود دارد، اما هتروژنیسیته بین این ایزوله‌ها و ایزوله‌های موجود در بانک‌ها قابل توجه است. بنابراین، ایزوله‌ها در گروه‌بندی مجزایی قرار گرفتند. همچنین، با وجود این که ناحیه *ITS1* این ایزوله‌ها مشابه با *Crithidia* بود، اما ناحیه *13A/13B* موجود روی میتوکندری مشابه با انواع گونه‌های *Leishmania* بود.

نتیجه‌گیری: از آن جایی که انگل *Crithidia* به عنوان انگلی تک میزبان گزارش شده است و انسان نمی‌تواند میزبان مناسبی برای این انگل باشد، حضور ژن‌های آن در انگل‌های مسبب لیشمانیوز جلدی، می‌تواند ناشی از ملاقات قبلی این دو انگل در یک میزبان مشترک یعنی پشه‌ی خاکی باشد. از آن جایی که تا به حال هیچ تکثیر جنسی در جنس *Leishmania* گزارش نشده است، احتمال وجود پدیده‌ی نوترکیبی وجود دارد.

واژگان کلیدی: *Crithidia*، *Leishmania major*، لیشمانیوز جلدی

ارجاع: آقائی میبیدی مینا، اسلامی گیلدا، توحیدفر مسعود، فتاحی بافقی علی، حسینی سعیده‌السادات، احمدیان سلمان، اللومی مراد. **بررسی خصوصیت مولکولی ایزوله‌های**

بالینی *Leishmania Major* دارای ناحیه *ITS1* مشابه با گونه‌های *Crithidia*. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۷؛ ۳۶ (۵۰۰): ۱۲۶۶-۱۲۶۱

Leishmania tropica و *Leishmania major* است (۳).

تشخیص به موقع بیماری، منجر به درمان به موقع و جلوگیری از پیچیده شدن درمان می‌شود. به خصوص که در مراحل ابتدایی درمان، می‌توان از راه‌های کم‌خطرتر نظیر سرمادرمانی، الکتروتراپی و ... استفاده نمود (۴). در ابتدا، تشخیص گونه‌ی انگل بر اساس اندازه، شکل زخم، مناطق جغرافیایی و تزریق به حیوانات آزمایشگاهی انجام می‌شد (۵). این روش‌ها، قادر به تشخیص دقیق و واقعی گونه‌ی انگل

مقدمه

لیشمانیوز که توسط تک‌یاخته‌ای از جنس *Leishmania* ایجاد می‌شود، بیماری است که شامل زخم‌های جلدی خودبه‌خود محدود شونده تا اشکال احشایی کشنده در صورت عدم درمان است (۱). سالانه، ۲ میلیون عفونت جدید رخ می‌دهد که ۱/۵ میلیون مورد مربوط به لیشمانیوز جلدی است (۲). لیشمانیوز جلدی، اغلب به دو صورت شهری و روستایی بروز می‌کند که عامل آن‌ها به ترتیب

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات سلامت و ایمنی غذا، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
- ۲- دانشیار، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات سلامت و ایمنی غذا، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
- ۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی و بیوتکنولوژی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
- ۴- دانشیار، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
- ۵- مرکز تحقیقات سلامت و ایمنی غذا، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
- ۶- استاد، آزمایشگاه تکنولوژی اطلاعات و ارتباطات و مهندسی الکترونیک، دانشگاه تونس، تونس، تونس

نویسنده‌ی مسؤو: گیلدا اسلامی

دستورالعمل شرکت انجام شد. بررسی کمی و کیفی DNA استخراج شده به ترتیب با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری و آگارز ژل الکتروفورز ۰/۸ درصد صورت گرفت.

تکثیر ناحیه‌ی 13A/13B و توالی‌یابی: برای تکثیر از دستگاه ترموسایکلر (ABI, SimpliAmp; USA) و پرایمرهای اختصاصی 13A/13B استفاده شد (۲). در تمام مراحل واکنش، نمونه‌ی استاندارد Leishmania major (MRHO/IR/75/ER) به عنوان شاهد مثبت و واکنش آب به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد. نتایج تکثیر با استفاده از آگارز ژل الکتروفورز ۲ درصد بررسی شد. تمام مراحل آزمایش حداقل سه بار تکرار شدند. محصول تکثیر، تعیین توالی شد و آنالیز توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای VectorNTI, Blastn, T-Coffee, Mega6 صورت گرفت.

نبودند. از این رو، همانند سایر پاتوژن‌ها، از تکنیک‌های مولکولی به عنوان جایگزین مناسبی استفاده شد (۶-۸). انواع ژن‌های هدف مورد استفاده و حفاظت شده در این زمینه، شامل بارکدهای میتوکندریایی و ژن‌های موجود روی ژنوم هسته هستند. یکی از مهم‌ترین نواحی مورد بررسی در مطالعات فیلوژنتیکی این انگل، بررسی ناحیه‌ی 13A/13B در میتوکندری است (۹). مطالعات اخیر توسط اسلامی و همکاران مشخص نموده است که تعدادی از ایزوله‌های بالینی، دارای توالی متفاوتی در ناحیه‌ی ITS1 هستند که تشابه بیش از ۹۰ درصد با Crithidia دارند (۱۰). از این رو، در مطالعه‌ی حاضر جهت بررسی مولکولی این ایزوله‌ها، از پرایمر اختصاصی ناحیه‌ی 13A/13B به روش Conventional polymerase chain reaction (Conventional PCR) استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج مربوط به Multiple alignment با استفاده از الگوریتم T-Coffee نشان داد که قسمتی از منطقی‌ی مورد مطالعه در ایزوله‌های ایرانی (ایزوله‌های ۱، ۳، ۹۸، ۱۰۰ و ۱۱۶) در طول تکامل حفظ شده است؛ به طوری که این محافظت‌شدگی، در قسمت وسط ناحیه‌ی مورد بررسی بیشتر بود. برعکس، نتایج Multiple alignment مربوط به ایزوله‌های ایرانی با شبیه‌ترین ایزوله‌های موجود در بانک اطلاعاتی نشان داد که کمترین شباهت و حفظ‌شدگی بین آن‌ها وجود دارد (شکل ۱).

روش‌ها

جمعیت مورد مطالعه: تعداد ۵ ایزوله با ITS1 دارای شباهت بیش از ۹۰ درصد با انواع گونه‌های Crithidia، از بانک سلولی موجود در آزمایشگاه تحقیقاتی مرکز سلامت و ایمنی غذا در دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد تهیه شد. این ایزوله‌ها، در محیط کشت حاوی ۸ درصد گلیسرول نگهداری شده بودند.

استخراج DNA استخراج DNA با استفاده از کیت مربوط (Exgene Cell SV; GeneAll; Korea; #106-101) و بر اساس



شکل ۱. بررسی توالی 13A/13B در ایزوله‌های مورد بررسی در این مطالعه با شماره‌های ۱، ۳، ۹۸، ۱۰۰ و ۱۱۶ از طریق

Multiple alignment و مقایسه‌ی آن‌ها با (به ترتیب از بالا به پایین) Leishmania infantum isolate montecristo_12

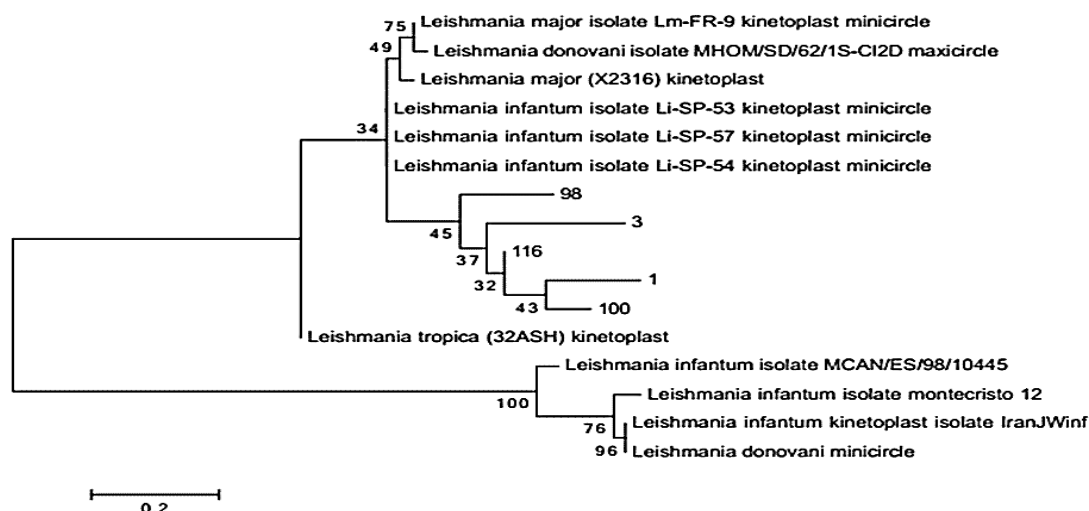
.L. infantum kinetoplast isolate IranJWinf .L. major isolate Lm-FR-9 kinetoplast minicircle

.L. donovani isolate MHOM/SD/62/1S/CI2D maxicircle .L. infantum isolate MCAN/ES/98/10445

.L. infantum isolate Li-SP-57 kinetoplast minicircle .L. donovani minicircle .L. major (X2316) kinetoplast

.L. infantum isolate Li-SP-53 kinetoplast minicircle .L. infantum isolate Li-SP-54 kinetoplast minicircle

(۲) L. tropica (32ASH) kinetoplast



شکل ۲. بررسی فیلوژنتیک ایزوله‌های مورد مطالعه (۱، ۳، ۹۸، ۱۰۰ و ۱۱۶) با ایزوله‌های *Leishmania infantum* isolate montecristo_12

L. infantum isolate .*L. infantum* kinetoplast isolate IranJWinf .*L. major* isolate Lm-FR-9 kinetoplast minicircle

L. major (X2316) kinetoplast .*L. donovani* isolate MHOM/SD/62/1S/CI2D maxicircle .MCAN/ES/98/10445

L. infantum isolate Li-SP-57 kinetoplast minicircle .*L. infantum* isolate isolate MCAN/ES/98/10445 .*L. donovani* minicircle

L. infantum isolate Li-SP-53 kinetoplast minicircle .*L. infantum* isolate Li-SP-54 kinetoplast minicircle

(۲) *L. tropica* (32ASH) kinetoplast

یک گروه مجزا را به خود اختصاص دادند که نشان می‌دهد تشابه معنی‌داری با سایر ایزوله‌ها ندارند. ضمن این که این داده‌ها تأییدی بر نتایج مربوط به Multiple alignment (شکل ۲) است که در این آنالیز هم تشابهی بین ایزوله‌های مورد مطالعه و سایر ایزوله‌ها وجود نداشت. گروه سوم، شامل ایزوله‌های *L. infantum* isolate montecristo_12 *L. infantum* *L. infantum* isolate MCAN/ES/98/10445 *L. donovani* minicircle و kinetoplast isolate IranJWinf بودند و سایر ایزوله‌ها در گروه چهار قرار گرفتند.

همان‌طور که در این خوشه‌بندی مشخص است، به جز گروه‌های سه و چهار که گونه‌های مختلف در یک خوشه قرار گرفته‌اند، در خوشه‌ی دوم که مربوط به ایزوله‌های مورد مطالعه است، همگی در یک خوشه قرار گرفتند.

بحث

تعیین توالی ناحیه‌ی 13A/13B در ایزوله‌های تحت مطالعه و آنالیز آن‌ها با استفاده از nBLAST و Multiple alignment، مشخص نمود که توالی تکثیر شده در ۵ ایزوله، ضمن این که نقاط محافظت شده‌ای داشتند، در بعضی قسمت‌ها (قسمت انتهایی) دارای هتروژنی بالایی بودند. وجود هتروژنی در مطالعه‌ای که توسط Zheng و همکاران با استفاده از همین پرایمر انجام شده بود، بین انواع گونه‌ها

آنالیز فیلوژنتیکی مربوط به ایزوله‌های مورد مطالعه نشان داد که ایزوله‌ها در سه خوشه قرار گرفتند. خوشه‌ی اول که شامل ایزوله‌های ۱۰۰، ۱۱۶ و ۹۸ است که شبیه‌ترین به هم هستند. خوشه‌ی دوم، شامل ایزوله‌ی ۱ و خوشه سوم، شامل ایزوله‌ی ۳ است که جداگانه قرار گرفتند (شکل ۲). بر اساس نتایج خوشه‌بندی، مشخص شد که اشتقاق ایزوله‌های ۱ و ۳ نسبت به بقیه‌ی ایزوله‌ها زودتر اتفاق افتاده است، اما زمان اشتقاق سه ایزوله‌ی دیگر، به طور تقریبی برابر بود و بعد از اشتقاق ایزوله‌های ۱ و ۳، اشتقاق آن‌ها صورت گرفت (شکل ۲). در جدول ماتریس تشابه، مشخص شد که کمترین ضریب عدم تشابه مربوط به ایزوله‌های ۱۰۰ و ۱۱۶ برابر با عدد ۰/۳۴ است و این دو ایزوله، شبیه‌ترین به هم هستند و بیشترین ضریب عدم تشابه مربوط به دو ایزوله‌ی ۳ و ۱۰۰ برابر با عدد ۰/۷۳ است که دورترین ایزوله نسبت به هم هستند.

آنالیز فیلوژنتیکی ایزوله‌های مورد مطالعه با شبیه‌ترین ایزوله‌های موجود در بانک‌های اطلاعاتی نشان داد که ایزوله‌ها را می‌توان به ۴ گروه مختلف خوشه‌بندی کرد (شکل ۲).

نتایج نشان داد که ایزوله‌های موجود در بانک اطلاعاتی به طور پراکنده در گروه‌های مختلف قرار گرفته‌اند؛ به طوری که ایزوله‌ی *Leishmania tropica* (32ASH) kinetoplast جدا از بقیه قرار گرفته است. خوشه‌ی دوم، مربوط به ایزوله‌های مورد مطالعه است که همگی

انگل گونه‌های *Crithidia*، جنس *Leishmania* تشخیص داده شد. از آن جایی که انگل *Crithidia* به عنوان انگلی تک میزبان گزارش شده است و انسان نمی‌تواند میزبان مناسبی برای این انگل باشد، حضور ژن‌های آن در انگل‌های مسبب لیشمانیوز جلدی در زخم و یا سایر نمونه‌های بالینی، می‌تواند ناشی از ملاقات قبلی این دو انگل در یک میزبان مشترک باشد. تنها میزبان مشترک این دو تک‌یاخته، داخل بدن پشه‌ی خاکی است. انگل گونه‌های *Crithidia* ساکن اصلی است و انگل *Leishmania* جهت انتقال از میزبان مهره‌دار به میزبان مهره‌دار دیگر، در پشه‌ی خاکی قرار می‌گیرد. از آن جایی که تا به حال هیچ تکثیر جنسی در خانواده‌ی *Kinetoplastida* گزارش نشده است. از این رو، احتمال می‌رود وجود پدیده‌ی نوترکیبی وجود دارد. پدیده‌ی نوترکیبی، در مطالعات گذشته نیز در انواع ایزوله‌ها و گونه‌های جنس *Leishmania* گزارش شده است (۱۹-۱۷، ۱۰). حتی در مورد تبادل محتویات ژنتیکی بین جنس *Leishmania* و *Crithidia* نیز مقالاتی به چاپ رسیده است (۲۰، ۱۰). مطالعات حاضر نیز تأییدی بر احتمال نوترکیبی بین جنس‌های متفاوت در خانواده‌ی *Kinetoplastida* است. در نهایت، وجود نوترکیبی بین انواع جنس‌های موجود در خانواده‌ی *Kinetoplastida*، امری طبیعی به نظر می‌رسد، اما جهت اثبات نهایی تحقیق بیشتر در این زمینه توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله، حاصل از پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد انگل‌شناسی پزشکی با شماره‌ی ۵۲۱۹ مصوب ۹۶/۷/۱۲ دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد می‌باشد. نویسندگان این مقاله، از معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد به جهت تصویب و حمایت مالی تشکر می‌کنند. همچنین، از کارکنان مرکز تحقیقات سلامت و ایمنی غذا نهایت تشکر و قدردانی را ابراز داریم.

گزارش شده است (۱۱). آن‌ها گزارش کردند که تمامی ایزوله‌های بالینی که *L. donovani* و *L. infantum* تشخیص داده شده بودند و مربوط به نقاط مختلف چین بودند، دارای هتروژنیسیتی بودند، اما گونه‌ی *L. infantum* در مناطق مختلف هتروژنیسیتی نشان ندادند که نتایج آن‌ها با یافته‌های این مطالعه هم‌خوانی دارد. البته، روش آن‌ها جهت تعیین هتروژنیسیتی تنها *Single-strand conformation polymorphism (SSCP)* بوده است و تعیین توالی برای نمونه‌ها انجام نشده بود. ایزوله‌های مورد بررسی در این مطالعه، همه از منطقه‌ی ورزشی اصفهان که یکی از مناطق اندمیک لیشمانیوز جلدی است، جدا شده بودند. هتروژنیسیتی در انواع گونه‌های *Leishmania* توسط Rogers و همکاران به اثبات رسیده است که مخالف با مطالعه‌ی حاضر است (۱۲). قابل توجه است که با روش‌های مختلفی که برای تشخیص جنس و گونه‌ی این انگل شناخته شده است (۱۵-۱۳)، مشخص می‌شود که احتمال دارد این هتروژنیسیتی حاصل از نوترکیبی و جهش باشد (۱۶).

آنالیز درخت فیلوژنی ایزوله‌های تحت مطالعه مشخص کرد که این ایزوله‌ها، با هم در یک گروه قرار نمی‌گیرند و بیشترین شباهت مربوط به دو ایزوله‌ی ۱۰۰ و ۱۱۶ است. ضمن این که آنالیز T-Coffee نشان داد که ۵ ایزوله‌ی مورد مطالعه، مناطق حفاظت شده‌ی هم دارند. در آنالیز درخت فیلوژنی نمونه‌های مربوط به بانک اطلاعاتی مشاهده شد که ایزوله‌های ایرانی، بر عکس سایر ایزوله‌ها، بار دیگر در یک گروه قرار گرفتند که می‌توان به قسمتی از مناطق حفاظت شده‌ی آن‌ها نسبت داد که در ناحیه‌ی ITS1 طبق آنالیز T-Coffee مشاهده شد.

با وجود هتروژنیسیتی پایینی که در ۵ ایزوله‌ی مورد بررسی در ناحیه‌ی 13A/13B مشخص شده است، مشاهده شد که تمامی ایزوله‌های تحت مطالعه با وجود تشابه ITS1 تا بیش از ۹۰ درصد با

References

1. Eslami G, Hajmohammadi B, Jafari AA, Mirzaei F, Gholamrezai M, Anvari H, et al. Molecular identification of *Leishmania tropica* infections in patients with cutaneous leishmaniasis from an endemic central of Iran. *Trop Biomed* 2014; 31(4): 592-9.
2. Mouttaki T, Morales-Yuste M, Merino-Espinosa G, Chiheb S, Fellah H, Martin-Sanchez J, et al. Molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis and identification of the causative *Leishmania* species in Morocco by using three PCR-based assays. *Parasit Vectors* 2014; 7: 420.
3. Mogalli NM, El Hossary SS, Khatri ML, Mukred AM, Kassem HA, El Sawaf BM, et al. Clinicoepidemiologic pattern of cutaneous leishmaniasis and molecular characterization of its causative agent in Hajjah governorate, northwest of Yemen. *Acta Trop* 2016; 163: 130-4.
4. Hejazi H, Eslami G, Dalimi A. The parasiticidal effect of electricity on *Leishmania major*, both in vitro and in vivo. *Ann Trop Med Parasitol* 2004; 98(1): 37-42.
5. Fotouhi-Ardakani R, Dabiri S, Ajdari S, Alimohammadian MH, Alaei-Novin E, Taleshi N, et al. Assessment of nuclear and mitochondrial genes in precise identification and analysis of genetic polymorphisms for the evaluation of *Leishmania* parasites. *Infect Genet Evol* 2016; 46: 33-41.
6. Boughattas S, Salehi R. Molecular approaches for detection and identification of foodborne pathogens. *J*

- Food Qual Hazards Control 2014; 1(1): 1-6.
7. Hajimohammadi B, Eslami G, Oryan A, Zohourtabar A, Pourmirzaei TH, Moghaddam AM. Molecular identification of *Sarcocystis hominis* in native cattle of central Iran: A case report. *Trop Biomed* 2014; 31(1): 183-6.
 8. Khosravi S, Hejazi SH, Hashemzadeh M, Eslami G, Darani HY. Molecular diagnosis of Old World leishmaniasis: real-time PCR based on trypanothione peroxidase gene for the detection and identification of *Leishmania* spp. *J Vector Borne Dis* 2012; 49(1): 15-8.
 9. Lopes EG, Geraldo Junior CA, Marcili A, Silva RD, Keid LB, Oliveira TM, et al. Performance of conventional PCRS based on primers directed to nuclear and mitochondrial genes for the detection and identification of *Leishmania* spp. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2016; 58: 41.
 10. Eslami G, Salehi R, Khosravi S, Doudi M. Genetic analysis of clinical isolates of *Leishmania major* from Isfahan, Iran. *J Vector Borne Dis* 2012; 49(3): 168-74.
 11. Zheng X, Hu X, Chen J. Analysis of kinetoplast DNA of *Leishmania* isolates in China by PCR-SSCP. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi* 1999; 17(6): 346-9. [In Chinese].
 12. Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol* 1990; 71(3): 267-75.
 13. Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 2002; 40(1): 210-5.
 14. Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 2006; 44(4): 1435-9.
 15. Azmi K, Nasereddin A, Ereqat S, Schnur L, Schonian G, Abdeen Z. Methods incorporating a polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism and their use as a 'gold standard' in diagnosing Old World cutaneous leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 71(2): 151-5.
 16. Rogers WO, Wirth DF. Kinetoplast DNA minicircles: regions of extensive sequence divergence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84(2): 565-9.
 17. Sharifi-Rad M, Dabirzadeh M, Sharifi I, Babaei Z. *Leishmania major*: Genetic Profiles of the Parasites Isolated from Chabahar, Southeastern Iran by PPIP-PCR. *Iran J Parasitol* 2016; 11(3): 290-5.
 18. Kelly JM, Law JM, Chapman CJ, Van Eys GJ, Evans DA. Evidence of genetic recombination in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 1991; 46(2): 253-63.
 19. Rougeron V, De Meeus T, Banuls AL. Reproduction in *Leishmania*: A focus on genetic exchange. *Infect Genet Evol* 2017; 50: 128-32.
 20. Eslami G, Frikha F, Salehi R, Khamesipour A, Hejazi H, Nilforoushzadeh MA. Cloning, expression and dynamic simulation of TRYP6 from *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER). *Mol Biol Rep* 2011; 38(6): 3765-76.

Molecular Characterization of Clinical Leishmania Major Isolates Harboring ITS1 Homology Similar to the One in Crithidia spp.

Mina Aghai-Maybodi¹, Gilda Eslami², Masoud Tohidfar³, Ali Fattahi-Bafghi⁴, Saeedeh Sadat Hosseini⁵, Salman Ahmadian¹, Mourad Elloumi⁶

Short Communication

Abstract

Background: Leishmaniasis is caused by the protozoan *Leishmania* spp. In some loci from Iran, some isolates have ITS1 like the one in *Crithidia* spp. Therefore, in this study, we analyzed molecular characters of the mentioned isolates.

Methods: DNA was extracted from all clinical isolates harboring ITS1 like the one in *Crithidia* spp. Amplification was performed using the specific primer pair of 13A/13B and followed by sequencing. The sequences were assessed using BLASTn, multiple alignment, T-coffee, and Vector NTI. Phylogenetic tree was used for grouping and analyzing the isolates.

Findings: Sequencing analyzing showed low heterogeneity among the mentioned isolates, but high heterogeneity between the mentioned isolates and the ones in genbank, therefore the mentioned isolates were grouped separately. Moreover, although ITS1 from the mentioned isolates were homolog to the ones in *Crithidia* spp., but 13A/13B loci on mitochondria showed homology with *Leishmania*.

Conclusion: As *Crithidia* is a monoxenous, and its natural host is flies, finding its genes in the agents of cutaneous leishmaniasis may show these parasites may meet each other in sandfly. Till now, no sexual reproduction has been reported in *Leishmania* spp., therefore it is likely recombinant.

Keywords: *Crithidia*, *Leishmania major*, Leishmaniasis, Cutaneous

Citation: Aghai-Maybodi M, Eslami G, Tohidfar M, Fattahi-Bafghi A, Hosseini SS, Ahmadian S, et al. **Molecular Characterization of Clinical Leishmania Major Isolates Harboring ITS1 Homology Similar to the One in Crithidia spp.** J Isfahan Med Sch 2018; 36(500): 1261-6.

1- MSc Student, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine AND Research Center for Food Hygiene and Safety, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

2- Associate Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine AND Research Center for Food Hygiene and Safety, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

3- Associate Professor, Department of Biotechnology, School of Life Science and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

4- Associate Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

5- Research Center for Food Hygiene and Safety, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

6- Professor, Laboratory of Technologies of Information and Communication and Electrical Engineering (LaTICE), University of Tunis, Tunisia

Corresponding Author: Gilda Eslami, Email: eslami.g2000@gmail.com