الارتقاء بالبحوث العلمية طريقنا لخدمة المجتمع

استخدام الجين ITS1-rDNA لتمييز انواع اللشمانيا الجلدية cutaneous leishmaniasis في مدينة تكريت

انتصار غانم عبدالوهاب الصميدعي ، بلقيس اسامة محمد

قسم علوم الحياة ، كلية التربية للبنات ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

معلومات البحث

الكلمات المفتاحية:

الاسم: انتصار غانم عبدالوهاب

البريد الاليكتروني: dr.ent79@gmail.com

رقم الهاتف:

الملخص

تم جمع 60 عينة من القروح الجلدية المشخصة سريرياً لافراد مصابين بداء اللشمانيا الجلدي **cutaneous leishmaniasis** الوافدين الى مستشفى صلاح الدين العام واحدى العيادات الطبية في مدينة تكريت للمدة الواقعة بين **(2017/10/24)** ولغاية **(2018/4/1)**، اختبرت العينات بطريقة المسحة المباشرة الرطبة ثم استخدمت تقنيتي ال **nPCR** و **PCR-RFLP** لتشخيص انواع اللشمانيا الجلدية المسببة للافات الجلدية (القرح).

نجح الفحص المجهري بتاكيد الاصابة لجميع العينات المفحوصة بنسبة 100% كما تضاعف الجين **ITS1** في 11 (18.33%) عينة من مجموع العينات الكلي، وبينت نتائج تقنيتي الـ **nPCR** باستخدام البادئ **SAC-VAN** في المرحلة الثانية للتفاعل و **PCR-RFLP** باستخدام الانزيم القاطع ***Hae III*** بان جميع العينات الموجبة كانت مصابة بكلا النوعين ***Leishmania major*** و ***Leishmania tropica***

بينت الدراسة ان الفئات العمرية 31–40 وفوق ال 40 سنة كانت اعلى الفئات العمرية تعرضاً للاصابه بنسبة 100% و 25% على التوالي، كما سجلت الاناث اعلى نسب اصابة بنسبة بلغت 22% تلاهم الذكور بنسبة 17% ، سجل ظهور 8 افات جلدية نسبه ظهور بلغت 100% تلاها ظهور افتين بنسبة 31%، كما ظهرت الافات الجلدية في الارجل بنسبه 25% وفي الوجه 16.7%.

المقدمة

تعد اللشمانيا الجلدية من الامراض الطفيلية الانتقالية التي تنتشر في العديد من المناطق في العالم خاصة البلدان الحارة والمعتدلة ومن هذهِ البلاد السعودية والعراق وسوريا وتعد من الامراض السائدة في قارة افريقيا واوربا واسيا وامريكا اللاتينية وتعد اللشمانيا من الامراض التي تصيب الحيوانات مثل الكلاب والقوارض والثعالب وتنتقل العدوى للإنسان[1].

تعد طفيلي اللشمانيا من الاوالي **Protozca** وهو وحيد الخلية ويوجد داخل الخلايا اجبارياً [2] ويستوطن خلايا الجهاز الشبكي والخلايا اللمفية في الجلد، وله نوعان يسببان المرض في العراق هي المدارية ***Leishmania tropica*** و ***Leishmania major*** [3].

ان الهدف من الدراسة هو عزل الطفيلي واستخلاص DNA وتشخيص نوعه باستخدام الجين **ITSI** بواسطة تقنية **PCR** بلمرة سلسلة تفاعل الحامض النووي DNA لغرض اجراء التنميط الجيني له ومعرفة توزيع الانماط الجينية المسببة لحبة بغداد في مدينة تكريت ودراسة تأثير الجانب الوبائي من حيث الجنس والسكن والعمر وعدد الآفات وحجمها وموقعها.

المواد وطرائق العمل

تم في هذه الدراسة جمع 60 عينة من قرح الاصابة لافراد مصابين بداء اللشمانيا الجلدية **cutaneous leishmaniasis** من المراجعين لمستشفى صلاح الدين العام واحدى العيادات الطبية في مدينة تكريت خلال الفترة الممتدة من شهر العاشر 2017/10/24 ولغاية شهر الرابع 2018/4/1 حيث تم تشخيص العينات الموجبة بإيجاد الطور عديم السوط **Amastigote**، ولفئات عمرية تراوحت بين سنة ولغاية 56 سنة.

1– تم عزل طفيليات اللشمانيا الجلدية من الافة الجلدية بعد قيام الطبيب المختص بتشخيصها. اذ تم وضع جزء من العينة على شريحة

زجاجية لغرض فحصه مجهرياً ووضع جزء اخر من العينة نفسها في الابندورف سعه 1.5 مل وحفظت بدرجة حرارة –20 لغرض استعماله في استخلاص الـ **DNA** فيما بعد.

2– استخلص **DNA** من عينة الدم المحفوظة في محلول **(Acid EDTA ACDS Citrate Dextrose Solution)** او انابيب حسب طريقه [4].

3– استخدم الجين ITS1 للكشف عن جنس طفيلي اللشمانيا الجلدية باستخدام بادئات متخصصة مصممة لهذا الغرض هي **LITSR (CTGGATCATTTTCCGATG)** و **L5.8S (TGATACCACTTATCGCACTT)** والتي تنتج حزمة بحجم **bp** 350~ باستخدام البرنامج التفاعلي المبين في جدول (1) [5]. ثم استخدم ناتج هذا التفاعل (والذي يعد هو التفاعل الاول) في الخطوتين اللاحقتين.

4– استخدمت تقنية **nPCR** للكشف عن نوع اللشمانيا الجلدية المسبب للافة الجلدية باستخدام بادئات متخصصة مصممة لهذا الغرض هي **SAC (CATTTTCCGATGATTACACC)** و **VAN2 (CGTTCTTCAACGAAATAGG)** والتي تنتج حزمة بحجم **bp** 280–330 باستخدام البرنامج التفاعلي المبين في جدول (1) [6]:–

الجدول (1) البرنامج التفاعلي والاضافات للجين ITS1 – SAC – VAN2

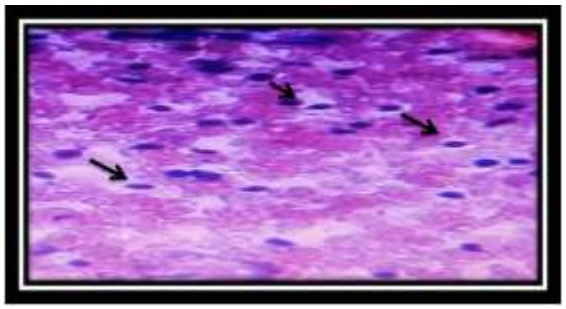
Gene مورث	Primer جين	Amplification conditions البرنامج التفاعلي	D.W ماء مقطر	F جين امامي	R جين خلفي	DNA (µl)	Total volume (µl) **الحجم الكلي**
ITS1	LITSR L5.8S	94°C For 5min		1	**1**	3	20
		94°C For 1min 62°C For 1min 51°C For 1min 72°C For 1min & 15 sec (10 cycles)	10				
		94°C For 1min 55°C For 1min 72°C For 1min & 15 sec (20 cycles)	15				
	SAC VAN2	94°C For 5min 94°C For 30s 52°C For 30s 72°C For 30s 72°C For 5min (30 cycles)	**9**	0,5	0,5	10^b	20

D.W=Distal water ، F =Forward ، R =Revers، 10^b =1/40

5– اجريت عملية التقطيع بواسطة الانزيم القاطع ***Hae III*** لناتج التفاعل الاول لغرض تمييز الانواع المختلفة لجنس اللشمانيا الجلدية ، حيث تم هضم القطع الناتجة بأخذ 5–10 مايكروليتر من ناتج التفاعل الاول (باستخدام البادئات **LITSR** و **L5.8S**) ووضع في انبوبة ابندورف حجم 0.2 مل واضيف اليها 1 مايكروليتر من الانزيم القاطع ***Hae III*** ثم حضن في الحاضنة بدرجة حرارة 37°C ليوم كامل وبعد انتهاء وقت التفاعل رحلت العينات بجهاز الترحيل الكهربائي بمقدار 5 مايكروليتر من العينة في هلام الاكاروز بتركيز 3%. [7].

النتائج والمناقشة

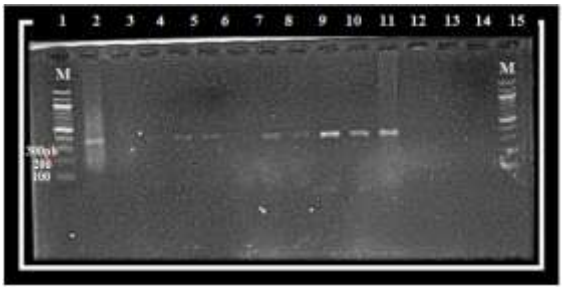
بين الفحص المجهري ان كل العينات المفحوصة كانت موجبة وذلك بملاحظة الطور عديم السوط **amastigote** في المسحات الماخوذة من الافات الجلدية



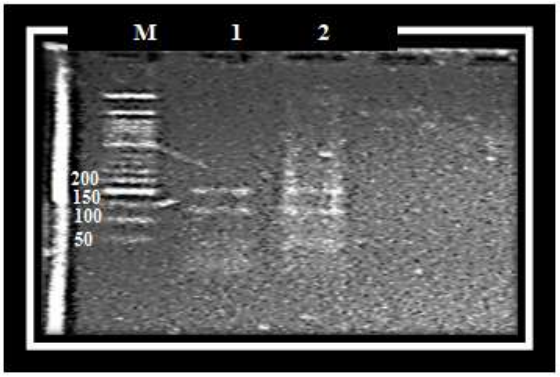
الشكل (1) طور Amastigote المصبوغ بصبغة كمزا والمشخص بالمجهر الضوئي لقوة تكبير X1000 لعينات المصابين بداء اللشمانيا الجلدية

من مجموع **60** عينة نجح الجين **ITS1** في التضاعف في 11 (18.33%) عينة من مجموع العينات الكلي باظهار الحزمة المطلوبة بحجم **bp** 350 (صورة رقم 1) ، كما اظهرت نتائج تحليل الـ **PCR-RFLP** للجين **ITS1** باستخدام الانزيم القاطع ***Hae III*** ان كل العينات الموجبة تعود للنوع ***Leishmania major*** وذلك بظهور

الحزمتين (**bp** 130 و **bp** 220) (صورة رقم 2) تشير هذهِ الحزم الى **DNA** الطفيلي. وبينت نتائج تقنية **nPCR** باستخدام البوادئ **SAC** و **VAN2** ان جميع العينات المفحوصة كان تعود للنوع ***Leishmania tropica*** بظهور الحزمة **330 bp** (صورة رقم 3)



الصورة (1) الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل الـPCRبهلام الاكاروز (2%) للجين LITSR، للكشف عن Leishmana (M) تمثل الدليل الحجمي لناتج PCR (100pb) DNA ladde العينات موجبة لطفيلي L-major حجم الحزم 350



الصورة رقم (2) الترحيل الكهربائي بهلام الاكاروز (3%) للتقطيع بانزيم *Haelll* **لناتج تضخيم** ITS1-gene ، (M) **تمثل الدليل الحجمي** DNA ladder (50pb) **العينة (1–2) موجبة لطفيلي** L-major **بظهور الحزمتين (130–220)**bp

صورة رقم (3) الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل الـ nPCR **بهلام الاكاروز (1%) للبادئ** SAC-VAN2 ، (M) **تمثل الدليل الحجمي لناتج التفاعل** DNA ladder (50pb) ، **العينات (1–11) موجبة للنوع** *tropica Leishmania* **بظهور الحزمة** 330bp.

بينت الدراسة ان الفئات العمرية 31–40 واكثر من اربعين سنة كانت اعلى الفئات تعرضا للإصابة جدول (1). وهذا لايتوافق مع ما ذكرته **[8]** اذ سجلت اعلى نسبة اصابة في الاطفال. كما بينت الدراسة ان الاعمار المصابة تراوحت بين 1–56 سنة وهذا يتفق مع العديد من الدراسات منها دراسة [9] و [10]

ان الاختلاف في نسبة الخمج او الاصابة في الدراسة الحالية الى الدراسات المذكورة السابقة ربما يعود الى اختلاف في توفير الخدمات الصحية والوسائل الوقائية ضد المضيف الناقل ذبابة الرمل (الحرمس) في المناطق السكنية والنظافة الشخصية، والكثافة السكانية والهجرة من مدن اخرى والنزوح الى المدينة والموقع الجغرافي وتكاثر ذبابة الرمل في اماكن معينة قريبة من الانهار والمستنقعات والظروف المناخية وعدد العينات المشخصة وطريقة تشخيصها وتقنية الفحص وحساسيتها ومدة الدراسة والفئات العمرية للأشخاص المصابين كذلك طريقة اخذ العينات وعزلها وكمية الحصول على DNA للطفيلي نقاوته وتركيزه وطريقة استخلاص المتبعة وبرامج الـ PCR والترحيل الكهربائي وظروف التجربة كلها عوامل يمكن ان تفسر اسباب الاختلاف فيما توصلت له مختلف الدراسات[11].

جدول (1) توزيع الاصابات باللشمانيا الجلدية حسب الفئة العمرية

الفئة العمرية	عدد العينات المفحوصة	عدد الاصابات	النسبة المئوية
10–1	30	3	%9
20–11	10	2	%20
30–21	9	1	%11
40–31	3	3	%100
40 ≤	8	2	%25
الكلي	60	11	%18.33

سجلت الاناث اعلى نسبة اصابة من الذكور بنسبة بلغت 22% و 17% على التوالي جدول (2) . وهذه النتائج تتفق مع ماذكره [9] في تركيا و **[8]** في سوريا اذ سجلا نسبة اصابة في الاناث اعلى من الذكور بلغت 64% ، 36% و 51.33% ، 48.66% على التوالي . ولم تتفق مع ما ذكره [10]

يمكن أن يعود ذلك إلى كون المناطق المدروسة من المناطق الريفية التي تتحمل فيه االمراة المسؤولية الأكبر في ما يتعلق بالأعمال الزراعية مما يجعل امكانية تعرضها للحشرة أكبر من امكانية تعرض الذكور، كما حاولت العديد من الدراسات ربط ارتفاع النسبة لدى الذكور مع الهرمونات الجنسية حيث بينت الدراسات امكانية الربط بين ارتفاع نسب الإصابة لدى الذكور ومستويات الهرمونات الجنسية (8).

جدول (2) توزيع الاصابات باللشمانيا الجلدية حسب الجنس

الجنس	عدد العينات المفحوصة	عدد الاصابات	النسبة المئوية
اناث	23	5	%22
ذكور	37	6	%17
الكلي	60	11	%18.33

يبين جدول (3) ان ظهور 8 افات جلدية كان في عينة واحدة فقط بينما سجل ظهور افتين اعلى نسبة ظهور بلغت 31% تلاه ظهور 4 افات بنسبة 25% وهذا يتفق مع ماسجلته **[8]** اذ سجل ظهور افتين جلديتين ثاني اعلى نسبة اصابة بظهورها في 43 عينة كما سجل [9] اختلافاً في أعداد الآفات الجلدية لكل مريض .

وربما يعزى سبب ارتفاع اعداد القرح المسجلة ضمن الدراسة الحالية مقارنة بما سجلته [2] اذ سجلت 1–12 قرحة للفرد وبمعدل 4 قرح للفرد يعزى السبب الى تطور سلالة جديدة للطفيلي في المدينة وربما يعود الى ما ذكره [12] من ان القرح المتعددة ناتجة عن اللسعات المتعاقبة والمتكررة لذباب الرمل.

جدول (3) توزيع الاصابات باللشمانيا الجلدية حسب عدد الافات الجلدية

عدد الافات	عدد العينات المفحوصة	عدد الاصابات	النسبة المئوية
1	30	5	%17
2	13	4	%31
3	4	0	%0
4	4	1	%25
5	2	0	%0
6	3	0	%0
7	1	0	%0
8	1	1	%100
9	1	0	%0
10	1	0	%0
الكلي	60	11	%18.33

بينت الدراسة ان الجذع سجل اعلى نسبة تعرض للاصابه بلغت 33.3% تلته اصابات الارجل بنسبه 25% فيما سجلت اصابات الوجه 16.7% .جدول (4) وهذا لايتفق مع ما سجله [9] حيث بين ان معظم المرضى لديهم آفة واحدة على وجوههم أو على أطرافهم العليا. وقد لوحظ أن الموقع الأكثر شيوعا للعدوى هو الوجه 47 ٪ ، تليها أذرع اليد 37 ٪ والساقين والقدم 16 ٪.

جدول (4) توزيع الاصابات باللشمانيا الجلدية حسب موقع الاصابة

موقع الافة	عدد العينات المفحوصة	عدد الاصابات	النسبة المئوية
اليد	31	5	%16
القدم	4	0	%0
الارجل	16	4	%25
الوجه	6	1	%16.7
الجذع	3	1	%33.3
الكلي	60	11	%18.33

جدول (5) توزيع الاصابات باللشمانيا الجلدية حسب حجم الافة

حجم الافة	عدد العينات المفحوصة	عدد الاصابات	النسبة المئوية
1–2 سم	13	3	%23
2–3 سم	17	4	%24
3–4 سم	17	2	%12
4–5 سم	9	2	%22
5–6 سم	4	0	%0
الكلي	60	11	%18.33

واختلف قطر الافات عموماً لدى الاشخاص المصابين حيث عانى 17 مريضاً من قرحة يتراوح قطرها بين 2–3 سم وبنسبة بلغت 24% فيما عانى 13 مريضاً من قرحة تراوح قطرها بين 1–2 سم بنسبة 23% . جدول (5)

المصادر

[1] W.H.O.(2010). WHO Technical report 949. Control of leishmaniasis Report of ameeting of the WHO Expert committee on the control of leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010.

[2] موكر، هنادي محسن مهدي، (2002). اللشمانيا الجلدية في محافظة البصرة. دراسة وبائية ومناعية وعلاجية. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة البصرة.

[3] Najim, W. S.; Salih ; Hanna, N.N and Marbut, M.M.(2007). Assessment of Leishmania Skin test and its relationship with the clinical form and duration of cutaneous Leishmaniasis. Tikrit med. J., 13(2): 136-140.

[4] Ali,S.M. ; Mahnaz, S. and Mahmood, T.(2008). Rapid genomic DNA extraction (RGDE). Forensic Science International: Genetics Supplement Series 1: 63–65

[5] Assarnia, S.(2017) .The identification of new leishmania using ITS1-rDNA gene . International Journal of Mosquito Research. 4(2): 44-51.

[6] Cruz, I.; Millet, A.; Carrillo, E.; Chenik, M.; Salotra, P.; Verma, S. Veland, N.; Jara, M.; Adaui, V.; Castrillón, C.; Arévalo, J.; Moreno, J. and Cañavate, C.(2013). An approach for interlaboratory comparison of conventional and real-time PCR assays for diagnosis of human leishmaniasis. Exp Parasitol. 134:281–9.

[7] El Tai, N.; Osman, O.; El Fari, M. ; Presber, W. and Schönian, G. (2000) .Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of Leishmania donovani spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. Trans Royal Soc Trop Med Hyg 94(5):575-9.

[8] علي، منال (2014) . تنميط أنواع الليشمانية المسؤولة عن الإصابات الجلدية في اللاذقية. جامعة دمشق . كلية الصيدلة . قسم الكيمياء الحيوية والاحياء الدقيقة. رساله ماجستير

[9] Gurses, G.; Ozaslan, M. ; Zeyrek, F.Y.; Ibrahim, H.; Kılıç ; Doni, N.Y. I.; Karagöz, D. and Uluca, N.(2018). Molecular identification of Leishmania

[11] الميالي، هادي مدلول (2009). دراسة الواقع البيني وعلاقته بانتشار القوارض والحشرات الناقلة للأمراض، القادسية لعلوم الطب البيطري– ملحق خاص ببحوث المؤتمر العلمي الثالث.

[12] Kadir, M. A. (1988). A study on cutaneous leishmaniasis in Arbil. Bull. End. Dis., 29: 51-56.

spp. isolates causes cutaneous leishmaniasis (CL) in Sanliurfa Province, Turkey, where CL is highly endemic . Folia Microbiol . 63: 353.

[10] Maraghi, S.; Mardanshah, O.; Rafiei, A.; Samarbafzadeh, A. and Vazirianzadeh, B. (2013). Identification of Cutaneous Leishmaniasis Agents in Four Geographical Regions of Khuzestan Province Using Nested PCR. Jundishapur Journal of Microbiology, 6 (4). pp. 1-4.

Using the ITS1-rDNA gene to distinguish cutaneous leishmaniasis in Tikrit

Intisar Ghanim Abdulwahhab , Balqees Osama mohammed

Department of Biology , College of Education for Women, Tikrit University, Tikrit , Iraq

Abstract

Sixty samples of clinically diagnosed skin lesions were collected for individuals with Cutaneous leishmaniasis. They were admitted to Salah al-Din General Hospital and a medical clinic in Tikrit between 24/10/2017 and 1/4/2018. Method of Wet Smear was used to diagnose Cutaneous leishmaniasis (ulcers). Then techniques like nPCR and PCR-RFLP were used.

microscopic results of Wet Smear was 100% Positive in of Sample clear, the results of the techniques mentioned above using the Primer SAC-VAN, the DNA ITS1 replication of the gene in 11 Sample (18.33%). The second phase of the reaction and PCR-RFLP using the restriction enzyme (Hae III) showed that All positive samples were infected with both types of leishmania tropica and major.

The study showed that the age groups 31-40 and above 40 years was the highest age groups with 100% infection possibility. The females recorded the highest infection 22%, followed by males with 17%. Patients With 8 Skin lesions revenled 100% of in Fection rate, Followed by Patients With Two skin. Lesions Showed 31% lnfection rate, Skin lesions in leg Was 25% and in Face 16%.