

بررسی ژن A2 در ایزوله‌های انگل لیثمانیا تروپیکای پوستی و احشایی ایران

سیما نوبری^{1*}، عزت نوری زاده²

1. دانشجوی دکتری مرکز تحقیقات ایمنولوژی، انیستیتوپاستور، تهران، ایران
2. استادیار، دپارتمان میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

چکیده

زمینه و هدف: لیثمانیوز یک بیماری مربوط به مناطق گرمسیری می‌باشد که طیف وسیعی از تظاهرات بالینی؛ شامل ضایعات پوستی تا عفونت احشایی کشنده را ایجاد می‌کند. ژن A2 به‌عنوان یکی از قابل‌اعتمادترین فاکتورهای ژنتیکی در ایجاد فرم احشایی به‌حساب می‌آید. این ژن در گونه‌های پوستی مانند *L. major* و *L. tropica* به‌صورت تک‌کپی و بدون بیان در انگل حضور دارد. هدف از این مطالعه، بررسی توالی ژن A2 در بین سوش‌های لیثمانیا تروپیکای پوستی با سایر سوش‌های لیثمانیا تروپیکای احشایی در ایران می‌باشد.

مواد و روش‌ها: لیثمانیا تروپیکای با ژن ITS1 و ITS2 تأیید هویت شدند، سپس سوش‌های انگل به موش BALB/c تزریق شدند. تغییرات اندازه و فرم زخم پای موش‌ها بررسی شد. سپس موش‌ها کشته شدند و اندام‌های احشایی آنها بررسی گردید. در نهایت ژن A2 بین گونه‌ها ارزیابی شد.

یافته‌ها: الگوی ژل الکتروفورز ژن A2 در سوش ایجادکننده فرم احشایی با سوش‌های ایجادکننده فرم پوستی متفاوت بود. همچنین الگوی ژل الکتروفورز ایجادکننده فرم پوستی با گزارش‌هایی که تا کنون در مورد لیثمانیا‌های پوستی وجود داشت نیز تفاوت نشان داد.

نتیجه‌گیری: گونه‌های خاص لیثمانیا تروپیکای احشایی‌شونده دارای توالی ژن A2 مانند سایر لیثمانیا‌های احشایی می‌باشند. به نظر می‌رسد ژن A2 در ایجاد توانایی احشایی شدن سوش‌های خاص انگل لیثمانیا تروپیکا نقش مهمی داشته باشد.

تاریخ دریافت:
1399/02/21
تاریخ پذیرش:
1399/04/17

کلیدواژه‌ها:

لیثمانیوزیس،
لیثمانیا
تروپیکا، ژن A2

1. مقدمه
پیدا شد که نشان‌دهنده شباهت 90 درصدی در سکانس آل‌های مختلف ژن A2 در گونه‌های *L. infantom* و *L. donovani* می‌باشد (7). خانواده ژن A2 از مهم‌ترین خانواده‌های ژنی لازم برای احشایی شدن انگل لیثمانیا می‌باشد (8). این ژن در آرایه‌های پشت‌سرم بر کروموزوم 22 انگل لیثمانیا قرار گرفته است (9). قابل توجه

ژنتیک و ایمنی میزبان، نوع انگل و نوع سوش انگل همگی از فاکتورهای تأثیرگذار در ایجاد شکل بیماری هستند (4, 5). اولین بار در سال 1994 ژن A2 در لیثمانیا دنووانی شناسایی شد (6, 7). در سال 2005 آلی جدید از ژن A2 در *L. infantom*

* نویسنده مسئول: سیما نوبری
نشانی: دانشجوی دکتری مرکز تحقیقات ایمنولوژی، انیستیتوپاستور، تهران، ایران

تلفن: 09126281614
رایانامه: simanobari@yahoo.com
شناسه ORCID: 0000-0003-2280-1071
شناسه ORCID نویسنده اول: 0000-0003-2280-1071

مجله علمی - پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دوره 28، شماره 3، مرداد و شهریور 1400، ص 449-456

رایانامه: journal@medsab.ac.ir

http://jsums.medsab.ac.ir
آدرس سایت:
شاپای چاپی: 1606-7487

2.1. سویه انگل

این مطالعه بر پنج سویه ایرانی از گونه انگل *لیشمانیا تروپیکا* به نام های (IPAS 175, IPAS 146, IPAS 22, IPAS 89) که از بخش ایمنولوژی انیستیتو پاستور ایران تهیه شده بود انجام گرفت. کلیه مراحل آزمایشگاهی در بخش ایمنولوژی انیستیتو پاستور و زیر نظر کمیته اخلاقی با کد (IR.PIL.REC.1396.062) انجام گردید.

2.2. تأیید گونه انگلی به وسیله تکثیر ژن ITS1 و ITS2 و بررسی الگوی RFLP

DNA ژنومیک با روش LiCl استخراج گردید (15). سوش های انگل از قبل تهیه شده و در تانک ازت مایع نگهداری می شدند، این سوش های انگلی از تانک ازت بیرون آورده شدند و بلافاصله پس از ذوب به محیط مایع RPMI انتقال یافتند. از این مایع که حاوی انگل است، برداشته و سپس روی محیط کشت NNN کشت داده شد. در روزهای سوم و پنجم پس از آغاز کشت، محیطها از نظر وضعیت رشد انگل و عدم آلودگی میکروبی و قارچی کنترل شدند و از انگل های روز پنجم (در فاز لگاریتمی) به منظور پاساژ دادن استفاده شد، پس از 2 تا 3 بار پاساژ انگل های تکثیر یافته به میزان مورد نظر رسیدند. سپس تزریق انگل های کشت داده شده به موش BALB/c به منظور ایجاد زخم در پای موشها انجام گرفت. برای این منظور از انگلها در فاز ایستایی (stationary) استفاده می شد، برای رسیدن به فاز ایستایی از کشت های روز هفتم پس از بررسی میکروسکوپی و تأیید وجود انگلها در فاز ایستایی استفاده شد. براساس شکل میکروسکوپی انگل های لیشمانیا در فاز ایستایی به شکل پروماستیگوت های دوکی دیده می شوند و در این مرحله اغلب پروماستیگوت های انگل دارای اندازه بزرگ و کشیده هستند و طول تاژک های آنها به حدود دو برابر طول بدن می رسد. پس از مشاهده فاز ایستایی انگلها توسط میکروسکوپ، انگلها با بافر فسفات PBS شستشو داده شدند، سپس انگلها با استفاده از لام نئوبار

است که ژن A2 در انواع پوستی لیشمانیا به شکل تکنسخه و شامل 153 جفت باز دیده می شود و همچنین این ژن در گونه های پوستی لیشمانیا پروتینی 51 اسید آمینه ای فاقد عملکرد راكد می کند (10).

بیشتر مطالعات تاکنون بر شکل پوستی گونه *لیشمانیا تروپیکا* متمرکز بوده اند و گزارش های محدودی در مورد شکل احشایی *لیشمانیا تروپیکا* وجود دارد. محمودزاده نیکنام و همکاران (1386) ایزوله های استثنایی از *لیشمانیا تروپیکا* که ایجادکننده فرم احشایی بیماری است را شناسایی کردند (11, 12). همچنین محمودزاده نیکنام و همکاران (1391) اولین مطالعه تجزیه و تحلیل توالی ژن A2 بر سویه های مختلف پوستی در گونه های انگل لیشمانیا در ایران را انجام دادند (11). شایان توجه است که در جنگ خلیج فارس طی سال های 70-1369 انگل *لیشمانیا تروپیکا* عامل ایجادکننده لیشمانیوز احشایی در سربازان امریکایی در بحرین و شمال عربستان سعودی بود. با توجه به شباهت ژئوگرافیکی بسیار زیاد بین بحرین و شمال عربستان سعودی با جنوب ایران به نظر می رسد *لیشمانیا تروپیکا* ممکن است یکی از عوامل ایجادکننده لیشمانیوز احشایی در جنوب ایران باشد و این یافته ها لزوم بررسی های بیشتر در مورد *لیشمانیا تروپیکا* احشایی شونده و نیز بررسی مهم ترین مکانیسم های ژنی در ایجاد فرم *لیشمانیا تروپیکا* احشایی را نشان می دهند (13, 14). اما تاکنون هیچ مطالعه ای در ایران بر ژن A2 در سویه های *L.tropica* که باعث ایجاد شکل احشایی لیشمانیوزیس می شود انجام نگرفته است. هدف از این مطالعه بررسی سکانس ژن A2 به عنوان پرکاربردترین ژن در افتراق نوع پوستی و احشایی انگل لیشمانیا بر ژنوم استخراجی از دو نوع سوش مختلف انگل *لیشمانیا تروپیکا* است تا نقش ژن A2 در احشایی شدن انگل لیشمانیا تروپیکا ایرانی بیشتر روشن شود.

2. مواد و روشها

دومیلیون انگل پروماستیگوت در فاز ایستایی به حجم ۵۰ ماکرولیتتر به صورت زیرجلدی به پای راست تزریق شد. تورم پای موش‌ها هر دو هفته یک بار طی شش ماه اندازه‌گیری و ثبت گردید (11). موش‌ها برای بررسی حضور انگل در احشا در 2 و 6 ماه بعد از تزریق کشته شدند و غده لنفاوی و طحال و کبد آن‌ها در زیر میکروسکوپ بررسی شدند (11).

4.2. تکثیر ژن A2

DNA ژنومیک با روش LiCl استخراج شد. برای تکثیر قطعه ژنی A2 از پرایمرهای L2/R2 استفاده شد توالی پرایمرها در ذیل آورده شده است.

L2 (5'-TTGGCAATGCGAGCGTCACAGTC-3')

R2 (5'-CAACGCGTACGATAATGCCACA-3') (19), (20)

شرایط انجام آزمایش PCR با پرایمرهای L2/R3 دناتوراسیون به مدت ۳ دقیقه در دمای ۹۴ درجه ۳۵ سیکل تکثیری شامل یک دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و یک سیکل اضافه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد می‌باشد.

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار آماری SPSS با نسخه 18 و از آزمون تی‌تست استفاده شد. نتایج حاصل از خوانش سکانس در سایت NCBI بررسی شد.

3. یافته‌ها

3.1. تأیید گونه انگل لیشمانیا

تروپیکا با استفاده از ژن ITS1

از تکثیر ژن ITS1(internal trance spacer1) در گونه IPAS 89 الگوی ژل الکتروفورز با باندهای حدود ۳۰۰ جفت باز به دست آمد. پس از هضم آنزیمی محصول PCR حاصل از ژن ITS1(internal transcribe spacer1) توسط آنزیم محدودکننده HaeIII باند ۱۰۰ جفت بازی مطابق انتظار روی ژل الکتروفورز به دست آمد. محصول PCR مستقیماً برای شرکت انجام‌دهنده سکانس فرستاده شد و نتایج حاصل از خوانش سکانس در سایت NCBI بررسی گشت که نتایج نشان‌دهنده تأیید سوش مورد مطالعه با گونه انگلی لیشمانیا تروپیکا بود. تکثیر DNA ژنومی چهار گونه انگلی دیگر توسط

شمارش شدند و به کمک PBS رقت مناسب برای تزریق به موش تهیه شد و به میزان 50 میکرولیتر (2 میلیون انگل) از محلول حاوی انگل به کف پای هر موش BALB/c تزریق شد (16). تکثیر ناحیه ژنی ITS1(internal transcribe spacer1) توسط پرایمر

LITSR(5'-CTGGATCATTTCGATG-3')

به عنوان پرایمر پیشرو و پرایمر L5.8S (5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3')

به عنوان پرایمر پیرو انجام گرفت. به منظور بررسی الگوی حاصل از RFLP از آنزیم محدودکننده HaeIII استفاده گردید که دارای توالی شناسایی GGCC روی DNA می‌باشد و سکانس مورد شناسایی به صورت انتهای صاف BLUNT توسط این آنزیم محدودکننده بریده شد. تکثیر قطعه ژنی ITS2(internal trance aspace2) توسط پرایمر

L5.8SR (5'-AAGTGGGATAAGTGGTA-3')

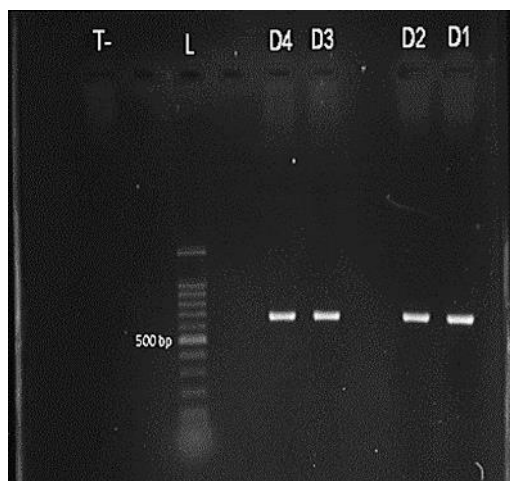
به عنوان پرایمر پیشرو و پرایمر LITSV (5'-ACACTCAGG TCTGTAAAC-3') به عنوان پرایمر پیرو انجام گرفت (13, 17). شرایط انجام آزمایش PCR ژن‌های ITS1/ITS2 به شرح ذیل است: دناتوراسیون اولیه به مدت ۲ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد انجام ۳۵ سیکل تکثیری PCR شامل ۲۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۵۳ درجه سانتی‌گراد و ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و سپس یک سیکل اضافه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ دقیقه می‌باشد (18). پس از تکثیر قطعات ژنی و به دست آمدن تک باند مناسب روی ژل الکتروفورز، با استفاده از آنزیم محدودکننده HaeIII طبق روش کار (کیت Fermentas) هضم آنزیمی روی محصول PCR انجام گرفت. پس از تعیین الگوی برش محصول به وسیله آنزیم محدودکننده در هر پنج گونه مورد استفاده در این تحقیق به منظور تعیین سکانس، محصول PCR به طور مستقیم برای انجام سکانس فرستاده شد (6, 18).

3.2. بررسی احشایی شدن انگل

لیشمانیا تروپیکا در موش BALB/c

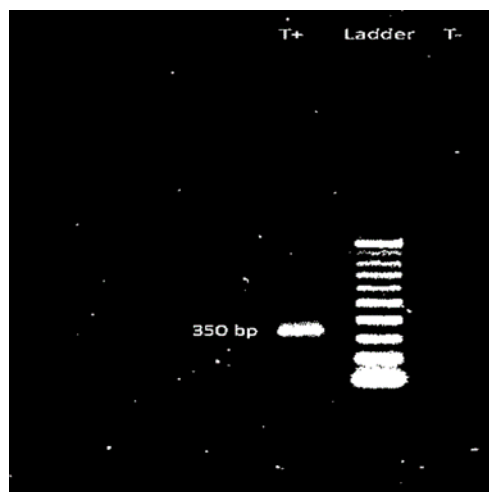
هریک از سویه‌های انگل لیشمانیا تروپیکا به ۶ عدد موش BALB/c ماده ۴-۶ هفته تزریق گردید. به هر موش

از تکثیر ژن ITS2(internal transcribe spacer2) در چهار گونه دیگر باندی در حدود ۷۰۰ جفت باز در روی ژل الکتروفورز به دست آمد. محصول PCR مستقیماً برای شرکت‌های انجام‌دهنده سکانس فرستاده شد و نتایج حاصل از خوانش سکانس در سایت NCBI بررسی شد. نتایج به دست آمده در شکل 1 نشان‌دهنده گونه انگلی لیشمانیا تروپیکا بودند.



پرایمرهای ژن شناسایی‌کننده گونه لیشمانیا به نام ITS1 جواب مناسبی نداد و الگوی ژل الکتروفورز چند باند به دست می‌آمد؛ بنابراین برای تأیید گونه انگلی، چهار گونه دیگر از پرایمرهای ژن ITS2 استفاده شد.

2.3. تأیید لیشمانیا تروپیکا با استفاده از ژن ITS2 گونه انگل



شکل 1. الگوی تکثیر ژل الکتروفور: ژن‌های تأییدکننده گونه انگلی الف- الگوی ژل الکتروفور حاصل از تکثیر ژن ITS1(internal transcribe spacer1): از تکثیر ژن ITS1 باند حدود ۳۵۰ جفت باز حاصل شد. ب- الگوی ژل الکتروفور حاصل از تکثیر ژن ITS2 (internal transcribe spacer2): از تکثیر ژن ITS2 باندی در حدود ۶۵۰ جفت باز حاصل شد. D4، D3، D2، D1: نمونه (T-، L(Ladder) کنترل منفی).

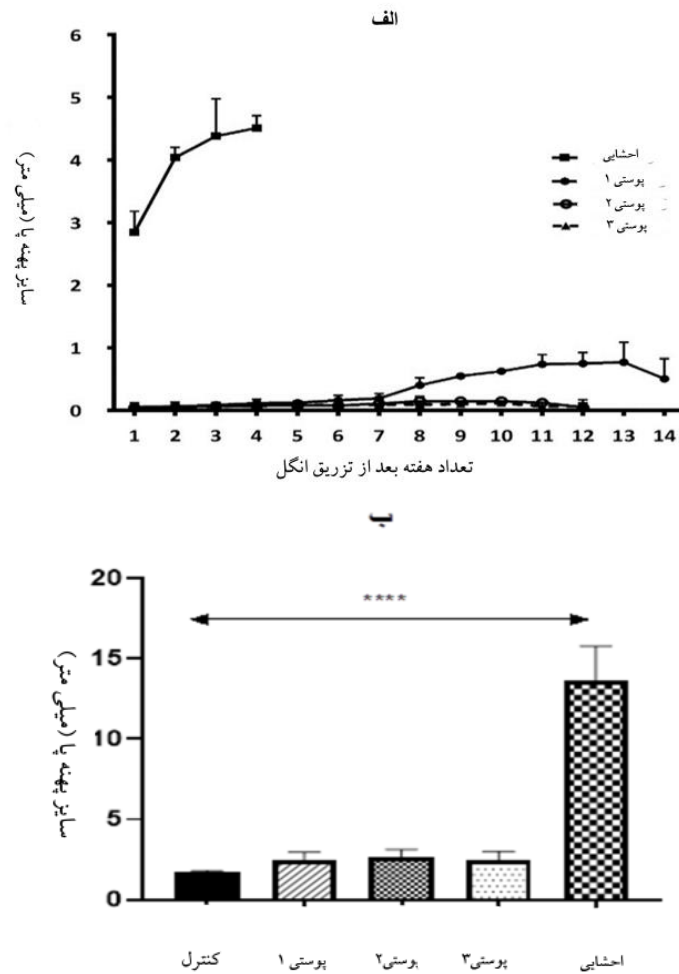
موش‌های IPAS 89 ۲ ماه پس از تزریق مردند و یک موش از این گروه ۶ ماه پس از تزریق مرد؛ بدین سبب تنها احشای سه موش از این گروه، بررسی شد. از غده لنفاوی، کبد و طحال موش‌ها در محیط کشت تری آن (NNN) کشت داده شد. در موش‌هایی که سویه‌های انگلی IPAS 175-IPA146- IPAS227 به آنها تزریق شده بود نتایج کشت اندام‌های احشایی موش‌ها بعد از شش ماه، حضور انگل در احشا در تعدادی از رقت‌ها دیده شد. اما در گونه IPAS 89 حضور انگل در احشا هم ۲ ماه پس از تزریق و هم در ۶ ماه پس از تزریق کاملاً مشهود بود (جدول 1).

3.3. نتایج بررسی تورم پهنه پای موش‌ها

پس از تزریق زیرجلدی انگل به موش‌ها هر دو هفته یک بار، تورم پهنه پای موش‌ها اندازه‌گیری و در نموداری رسم می‌شد (شکل 2).

4.3. نتایج کشت اندام‌های احشایی موش‌ها

نیمی از موش‌های هر گروه ۲ ماه پس از تزریق انگل و نیمی دیگر از موش‌ها ۶ ماه پس از تزریق انگل کشته شدند. اندام‌های احشایی (کبد، طحال و غده لنفاوی) موش‌های کشته شده برای تعیین حضور یا نبود انگل، بررسی شدند. نتایج حاصل از کشت اندام‌های احشایی موش‌ها در جدول 1 آورده شده است. شایان ذکر است که دو موش از گروه



شکل 2. بررسی تورم پهنه پای موش‌های BALB/c پس از تزریق سویه‌های مختلف انگل لیشمانیا تروپیکا: الف) اندازه‌گیری پهنه پای موش‌ها طی ۱۴ هفته پس از تزریق: اندازه‌گیری پهنه پای موش‌ها طی ۱۴ هفته پس از تزریق انجام گرفت. تورم پای موش‌های گروهی که به آنها سویه انگلی IPAS 89 تزریق شده بود به علت تهاجم انگل به احشا به شدت افزایش یافت و پای موش‌های این گروه دو ماه پس از تزریق به علت نکروز شدید دیگر قابل اندازه‌گیری نبودند ب) سایز زخم پای موش‌ها: میانگین زخم پای موش‌هایی که انگل لیشمانیا احشایی تزریق شده است نسبت به موش‌هایی که انگل لیشمانیا پوستی تزریق شده است به صورت معنی‌داری بالا می‌باشد (0.0001 p.v=).

جدول ۱. بررسی حضور انگل در اندام‌های احشایی موش‌ها

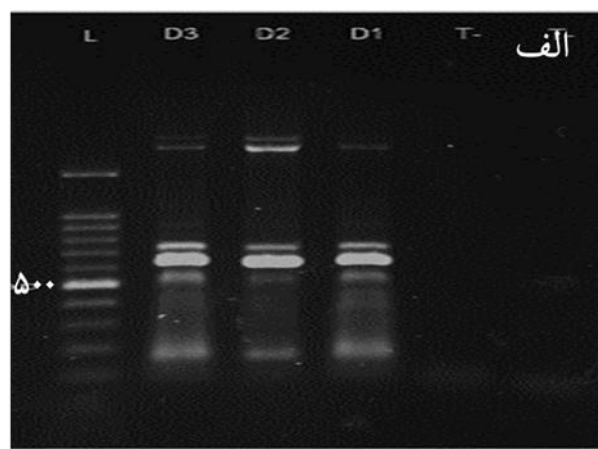
| گروه | شماره موش | غده لنفاوی | | کبد | | طحال | | رقت 1/100 | |
|----------|-----------|------------|----------|----------|-----------|----------|----------|-----------|---|
| | | بدون رقت | بدون رقت | رقت 1/10 | رقت 1/100 | بدون رقت | رقت 1/10 | | |
| IPAS 175 | 2 ماه | 1 | + | - | - | - | - | - | |
| | 2 ماه | 2 | + | - | - | - | - | - | |
| | | 3 | + | - | - | - | - | - | |
| | | 6 ماه | 1 | + | - | - | + | + | + |
| | IPAS 146 | 2 ماه | 2 | + | - | - | - | - | - |
| | | | 3 | + | - | - | - | - | - |
| 4 | | | + | - | - | - | - | - | |
| 6 ماه | | 5 | + | - | - | - | + | - | |
| | | 6 | + | - | - | - | - | - | |

| | | | | | | | | |
|----------|-------|---|---|---|---|---|---|---|
| IPAS 227 | 2 ماه | 1 | + | - | - | - | - | - |
| | | 2 | + | - | - | - | - | - |
| | | 3 | + | - | - | - | - | - |
| | 6 ماه | 4 | + | - | - | - | - | - |
| | | 5 | + | - | - | - | - | + |
| | | 6 | + | - | - | - | - | - |
| IPAS 89 | 2 ماه | 1 | + | + | + | + | + | + |
| | | 2 | + | + | + | + | + | + |
| | 6 ماه | 3 | + | + | + | + | + | + |

الکتروفورز زیر به دست آمد (شکل 3).

5.3. نتایج تکثیر ژن A2

از تکثیر ژن A2 با استفاده از پرایمرهای L2 و R3 الگوی ژل



شکل 3. الگوی ژل الکتروفور (gele electrophoresis) حاصل از تکثیر DNA انگلیشمانیا با پرایمرهای مخصوص ژن A2. الف) تکثیر ژن A2 در سوش لیشمانیا تروپیکا ایجادکننده فرم احشایی (ب) تکثیر ژن A2 در گونه لیشمانیا تروپیکا ایجادکننده فرم پوستی

باند موردنظر در ژل الکتروفورز دو مرتبه از نمونه IPAS 175 باند ۶۵۰ جفت بازی با استفاده از کیت Tian gene استخراج و برای سکانس فرستاده شد اما نتیجه مناسبی از خوانش سکانس این باند به دست نیامد. باند ۳۰۰ جفت بازی پس از استخراج از ژل الکتروفورز توالی مانند سایر گزارش‌هایی که تا کنون در مورد ژن A2 در گونه‌های پوستی لیشمانیا تروپیکا وجود دارد نشان داد.

4. بحث و نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد گونه‌های استثنایی از لیشمانیا تروپیکا هستند که تمایل به احشایی شدن دارند و الگوی ژن A2 در آنها برخلاف گونه‌های معمول لیشمانیا تروپیکا پوستی چند کپی

با وجود بهینه‌سازی‌های متعدد؛ از جمله رقت‌دهی به DNA و گرادیان دمایی و انجام آزمایش PCR در غلظت‌های متفاوت MgCl2 از تکثیر ژن A2 الگوی ژل الکتروفورز تک‌باند حاصل نشد. از تکثیر ژن A2 در سوش لیشمانیا تروپیکا ایجادکننده فرم احشایی دو باند مشخص ۳۵۰ و ۶۵۰ جفت بازی در الگوی ژل الکتروفورز به دست آمد و همچنین از تکثیر ژن A2 در گونه لیشمانیا تروپیکا ایجادکننده فرم پوستی باند ۶۵۰ جفت بازی در الگوی ژل الکتروفورز به دست آمد.

برای تأیید صحت شرایط انجام PCR از DNA انگلی L.infantum استفاده شد که الگوی تک‌باند و مطابق با گزارش‌های قبلی را نشان می‌داد. برای به دست آوردن سکانس

مطالعه نشان داد که سوش‌های جدیدی از *لیشمانیا تروپیکا* وجود دارند که برخلاف سوش‌های معمول احشایی‌شونده می‌باشند. همچنین مشخص شد حضور یا نبود ژن A2 در سویه‌های کار شده در این تحقیق، عامل ایجادکننده فرم احشایی بیماری نیست بلکه تعداد ژن A2 در این سویه‌ها متفاوت است.

در هر دو نوع گونه ایجادکننده فرم احشایی و ایجادکننده فرم پوستی *لیشمانیا تروپیکا* باند ۶۵۰ جفت بازی به دست آمد اما باند ۳۵۰ جفت بازی تنها در گونه ایجادکننده فرم احشایی *لیشمانیا تروپیکا* مشاهده شد. با توجه به اینکه گونه‌های خاص *لیشمانیا تروپیکا* احشایی‌شونده دارای توالی ژن A2 مانند سایر لیشمانیاهای احشایی می‌باشند به نظر می‌رسد ژن A2 در ایجاد توانایی احشایی شدن در خصوص سوش‌های خاص انگل *لیشمانیا تروپیکا* نقش مهمی داشته باشد. پیشنهاد می‌شود سوش‌های بیشتری از گونه انگل *لیشمانیا تروپیکا* بررسی شوند.

تشکر و قدردانی

از مسئولین محترم بخش ایمنولوژی انیستیتو پاستور ایران که در مراحل مختلف تحقیقات یاری رساندند تشکر و قدردانی می‌شود.

می‌باشد. تأیید گونه انگل *لیشمانیا تروپیکا* با تکثیر ژن ITS1 و ITS2 انجام گرفت. با تزریق انگل‌های *لیشمانیا تروپیکا* احشایی به موش‌های BALB/c و کشت اندام‌های احشایی موش‌ها، انگل در کبد و طحال موش‌ها مشاهده شد. از تکثیر توالی ژن A2 در گونه‌های احشایی‌شونده توالی ۳۰۰ و ۶۰۰ جفت بازی به دست آمد و گونه‌های ایجادکننده فرم پوستی تنها توالی ۶۰۰ جفت بازی را نشان دادند.

یکی از مهمترین عوامل در ایمنی برابر انگل *لیشمانیا*، وضعیت ژنتیکی میزبان است که این مسئله می‌تواند در سیر بیماری در میزبان تأثیرگذار باشد (21). عوامل مؤثر دیگر در سیر بیماری میزبان، گونه و سویه انگل می‌باشند (18, 20). *لیشمانیا تروپیکا* می‌تواند در موش BALB/c هر دو لیشمانیوز پوستی و احشایی را ایجاد کند و باعث مرگ موش شود. این نمونه‌ها ممکن است در مورد انسان نیز صدق کند (11, 12). تاکنون گزارش‌های موجود در مورد توالی ژن A2، تنها در مورد *لیشمانیا تروپیکا* ایجادکننده فرم پوستی، موجود می‌باشد که باندی در حدود ۳۵۰ جفت از ژن A2، گزارش شده است (6, 18, 22). نتایج جدید به دست آمده از این

References

- [1]. Akhoundi M, Downing T, Votýpka J, Kuhls K, Lukeš J, Cannet A, et al. Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. *Molecular aspects of medicine*. 2017;57:1-29.
- [2]. Schönian G, Lukeš J, Stark O, Cotton JA. Molecular evolution and phylogeny of Leishmania. *Drug Resistance in Leishmania Parasites*: Springer; 2018. p. 19-57.
- [3]. Darcis G, Van der Auwera G, Giot J-B, Hayette M-P, Tassin F, Estrada JA, et al. Recurrence of visceral and muco-cutaneous leishmaniasis in a patient under immunosuppressive therapy. *BMC infectious diseases*. 2017;17(1):478.
- [4]. Caraballo L, Coronado S. Parasite allergens. *Molecular immunology*. 2018;100:113-9.
- [5]. Ekroth AK, Rafaluk-Mohr C, King KC. Host genetic diversity limits parasite success beyond agricultural systems: a meta-analysis. *Proceedings of the Royal Society B*. 2019;286(1911):20191811.
- [6]. Farahmand M, Atashi Shirazi H, Nahrevanian H, Hajjaran H. Molecular Analysis of A2-genes Encoding Stage-specific S Antigen-like Proteins among Isolates from Iranian Cutaneous and Visceral Leishmaniasis. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2011;14(5):407-13.
- [7]. Oliveira TM, de Vasconcelos EJ, Nakaghi AC, Defina TP, Jusi MM, Baldani CD, et al. A novel A2 allele found in Leishmania (*Leishmania*) *infantum* chagasi. *Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology : Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*. 2011;20(1):42-8.
- [8]. de Souza CdSF, Calabrese Kds, Abreu-Silva A, Carvalho LOP, Cardoso FdO, Dorval M, et al. Leishmania amazonensis isolated from human visceral leishmaniasis: histopathological analysis and parasitological burden in different inbred mice. *Histol Histopathol*. 2018;33(7):11965.
- [9]. Zhang WW, Matlashewski G. Screening Leishmania donovani - specific genes required for visceral infection. *Molecular microbiology*. 2010;77(2):505-17.
- [10]. Mendes TM, Roma EH, Costal-Oliveira F, de Carvalho Dhom-Lemos L, Toledo-Machado CM, Bruna-Romero O, et al. Epitope mapping of recombinant Leishmania donovani virulence factor A2 (recLdVFA2) and canine leishmaniasis diagnosis using a derived synthetic bi-epitope. *PLoS neglected tropical diseases*. 2017;11(5):e0005562.
- [11]. Mahmoudzadeh-Niknam H, Ajdary S, Riazi-Rad F, Mirzadegan E, Rezaeian A, Khaze V, et al. Molecular epidemiology of cutaneous leishmaniasis and heterogeneity of Leishmania major strains in Iran. *Trop Med Int Health*. 2012;17(11):1335-44.

- [12]. Mahmoudzadeh-Niknam H, Kiaei SS, Irvani D. Viscerotropic growth pattern of *Leishmania tropica* in BALB/c mice is suggestive of a murine model for human viscerotropic leishmaniasis. *The Korean journal of parasitology*. 2007;45(4):247-53.
- [13]. Ghatee MA, Mirhendi H, Karamian M, Taylor WR, Sharifi I, Hosseinzadeh M, et al. Population structures of *Leishmania infantum* and *Leishmania tropica* the causative agents of kala-azar in Southwest Iran. *Parasitology research*. 2018;117(11):3447-58.
- [14]. Rostamian M, Jafari D, Abolghazi M, Farahani H, Niknam HM. *Leishmania tropica*: suggestive evidences for the effect of infectious dose on pathogenicity and immunogenicity in an experimental model. *Parasitology research*. 2018;117(9):2949-56.
- [15]. Yi L, Li X, Yan B. Comparison of methods for simultaneous extraction of DNA and RNA from seaweeds. *Fisheries Science (Dalian)*. 2011;30(11):693-7.
- [16]. Mahmoudzadeh-Niknam H, Abrishami F, Doroudian M, Moradi M, Alimohammadian M, Parvizi P, et al. The Problem of Mixing up of *Leishmania* Isolates in the Laboratory: Suggestion of ITS1 Gene Sequencing for Verification of Species. *Iranian journal of parasitology*. 2011;6(1):41-8.
- [17]. Mosleh IM, Schönian G, Kanani K, Shadfian B. *Leishmania* major cutaneous leishmaniasis outbreak in the Jordanian side of the Northern Jordan Valley. *Pathogens and global health*. 2018;112(1):22-8.
- [18]. Garin YJ, Meneceur P, Pratlong F, Dedet JP, Derouin F, Lorenzo F. A2 gene of Old World cutaneous *Leishmania* is a single highly conserved functional gene. *BMC infectious diseases*. 2005;5:18.
- [19]. Mohammadiha A, Dalimi A, Mohebbali M, Sharifi I, Mahmoudi M, Mirzaei A, et al. Molecular identification and phylogenetic classification of *Leishmania* spp. isolated from human cutaneous leishmaniasis in Iran: A cross-sectional study. *Iranian journal of parasitology*. 2018;13(3):351.
- [20]. Echchakery M, Chicharro C, Boussaa S, Nieto J, Carrillo E, Sheila O, et al. Molecular detection of *Leishmania infantum* and *Leishmania tropica* in rodent species from endemic cutaneous leishmaniasis areas in Morocco. *Parasites & vectors*. 2017;10(1):454.
- [21]. Awasthi A, Mathur RK, Saha B. Immune response to *Leishmania* infection. *The Indian journal of medical research*. 2004;119(6):238-58.
- [22]. Zhang WW, Matlashewski G. Characterization of the A2-A2rel gene cluster in *Leishmania donovani*: involvement of A2 in visceralization during infection. *Molecular microbiology*. 2001;39(4):935-48.

Analysis of A2 gene in dermo tropic and viscerotropic isolates of Iranian *Leishmania tropica*

Sima Nobari^{1*}, Ezzat Nourizadeh²

1. Ph.D. candidate at Department of Immunology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
2. Assistant Professor, Department of Biology, College of Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

Abstract

Introduction: Leishmaniasis is a disease in tropical regions, that includes a wide range of clinical protests, from skin lesions to fatal visceral infections. A2 gene is accounted as one of the most reliable genetic factors cause visceral form. This gene is a single copy without functional expression in the species causing skin form of the disease such as *L. major* and *L. tropica*. The aim of our study is to evaluate A2 gene sequence in the strains that cause skin form of disease and compare it with other exception strains of the *Leishmania tropica* strains in Iran.

Materials and Methods: *Leishmania* species were detected using ITS1 and ITS2. The parasites were injected into BALB/c mice and monitored of footpad inflammation in BALB/c mice. after a certain period of time the mice were killed and their visceral organs were examined for the presence of parasites. Finally, A2 gene sequence analyzed.

Results: A2 gene in a strain causing visceral form was different to a gel electrophoresis pattern of skin form causing strains. Also, the gel electrophoresis pattern of A2 gene in strains causing skin form was different to previous reports of cutaneous leishmaniasis.

Conclusion: The results of this recent experiment showed that the gel electrophoresis pattern of A2 gene in especial strains causing visceral form was similar to previous reports of visceral leishmaniasis. It seems that this gene may play an important role in the visceral ability of specific strains of *Leishmania tropica*.

Received: 2020/05/10

Accepted: 2020/07/07

Keywords: leishmaniasis ,
Leishmania tropica , A2 gene