Archive of SID

شناسایی گونه‌های لیشمانیای جداشده از بیماران مبتلا به سالک در کرمانشاه با روش RAPD-PCR

یزدان حمزوی[1]*؛ بیژن نعمان‌پور[2]؛ علی گرگین‌کرجی[3]

چکیده

مطالعه حاضر با هدف مشخص کردن گونه لیشمانیای عامل بیماری سالک با روش *RAPD- PCR* در بیماران مورد بررسی انجام شد. هفت ایزوله لیشمانیا از بیمارانی که هیچ‌گونه سابقه مسافرت به مناطق خارج از استان نداشته‌اند، جداسازی و در محیط *NNN* کشت شد. پس از تکثیر انبوه لپتومونادها در محیط *RPMI 1640*، *DNA* آن‌ها جدا شده و با روش *RAPD- PCR* تعیین گونه شدند. مطالعه باندهای به‌دست‌آمده نشان داد که گونه عامل بیماری در این افراد *Leishmania major* می‌باشد. به‌نظر می‌رسد که لیشمانیا ماژور عامل اصلی لیشمانیوز جلدی در استان کرمانشاه باشد.

کلیدواژه‌ها: لیشمانیوز جلدی، *RAPD-PCR*، کرمانشاه، ایران

«دریافت: 1388/10/20 پذیرش: 1389/2/28»

1. گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

2. کارشناس ارشد میکروب شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

3.گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

*** عهده‌دار مکاتبات:** کرمانشاه، بلوارطاق بستان، خیابان دانشگاه، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، تلفن: 0831-4274622

Email: yhamzavi@kums.ac.ir

مقدمه

ایران یکی ازمهم‌ترین مناطق اندمیک لیشمانیوز جلدی یا سالک در جهان است. عامل بیماری ناشی از تک یاخته Leishmania از گروه تاژکداران خونی-نسجی است. در این بیماری زخم‌هایی در پوست ایجاد می‌شود که پس از بهبودی، جای زخم(Scar) باقی می‌ماند. سازمان جهانی بهداشت، بیماری لیشمانیوز را یکی از بیماری‌های مهم انگلی در سطح جهان معرفی نموده و انجام مطالعه و تحقیق در زمینه‌های مختلف این بیماری را مورد تأکید قرار داده است (1 و 2).

در ایران بیماری به دو فرم مهم خشک (شهری) و مرطوب (روستایی) وجود دارد که به‌ترتیب توسط Leishmania tropica و Leishmania major ایجاد می‌شوند. روش‌های متفاوتی برای تعیین گونه انگل‌های لیشمانیا مورد استفاده قرار می‌گیرند. از جمله روش ایزوآنزیم که به‌عنوان روش استاندارد طلایی برای شناسایی گونه‌های لیشمانیا معرفی شده است. متأسفانه این روش بسیار وقت‌گیر و پرهزینه بوده لذا معمولاً در مراکز محدود و خاصی از جهان انجام می‌شود (3). امروزه بیشتر از روش‌های دیگری که بر اساس ساختمان ژنتیکی سلول‌ها می‌باشد، استفاده می‌گردد. از جمله این روش‌ها می‌توان به روش‌های مختلف PCR مانند RAPD-PCR (random amplification of Polymorphic DNA) اشاره نمود که به فراوانی در مطالعات مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند. با استفاده از این روش‌ها مطالعات فراوانی هم برای تشخیص بیماری و هم برای تعیین گونه لیشمانیا در بیماران، ناقلین و مخازن آن در ایران و سایر نقاط جهان انجام شده است (7-4).

در استان کرمانشاه، به‌خصوص در مناطق گرمسیری آن با توجه به شرایط اقلیمی، اکولوژیکی و وجود ناقلین

www.SID.ir

Archive of SID

بیماری، بالقوه امکان اپیدمیک شدن بیماری وجود دارد. برخی مطالعات حاکی از وجود احتمالی کانون‌هایی از بیماری در برخی مناطق استان مانند سرپل‌ذهاب و قصرشیرین هستند (9). تعیین گونه انگل با توجه به تفاوت‌های اساسی موجود در ویژگی‌های بالینی، دوره بیماری و نیز ویژگی‌های اپیدمیولوژیک مانند ناقلین، مخازن، نحوه پیشگیری و کنترل لیشمانیوز جلدی شهری و روستایی دارای اهمیت خاص است. همچنین تعیین چگونگی پراکندگی سالک شهری و روستایی در کشور حایز اهمیت است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه بیمارانی که از مناطق مختلف استان کرمانشاه به‌منظور تشخیص بیماری سالک به آزمایشگاه کلینیک ویژه دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه مراجعه می‌کردند مورد بررسی قرار گرفتند. ابتدا از محل زخم بیمار، نمونه‌گیری بر روی لام انجام شده و گسترش‌های تهیه‌شده با روش گیمسا رنگ‌آمیزی شدند. ضمن تکمیل پرسشنامه‌ای برای هر یک از بیماران در مورد سابقه مسافرت آن‌ها به خارج از استان کرمانشاه سؤال می‌شد. آنگاه نمونه‌ها از نظر وجود اجسام لیشمن مورد بررسی میکروسکوپی قرار می‌گرفتند. همچنین از سروزیته زخم آن‌ها بر روی محیط کشت NNN (random nicol novi and mac nil medium) کشت داده شد. در میان نمونه‌های مثبت، فقط آن دسته از بیمارانی که هیچ‌گونه سابقه‌ای از مسافرت به خارج از استان را نداشتند، وارد مطالعه شده و بقیه موارد از مطالعه خارج شدند.

نمونه‌های رشدیافته در محیط NNN برای تکثیر انبوه در محیط RPMI–1640 پاساژ داده شده (10) و بعد DNA آن‌ها جدا گردید. نمونه‌های به‌دست‌آمده تا زمان آزمایش در یخچال نگه‌داری شدند. هفت نمونه DNA به‌دست‌آمده از ایزوله‌های جداشده به‌منظور تعیین گونه با روش RAPD–PCR مورد بررسی قرار گرفتند و محصول کار با روش الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت. پرایمرهایی که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند شامل: Ab1-O1 (TCG CTC C GTT)، Ab1-O7 (GGT GAC GCA G)، M13 (GTA AAA CGA CGG)، CBa (CCA GT GG GTT GGT GTA A)، Cb1 (ATG GGA) و Cb2 (GCC ACC ACG TAC GAG GAG CGG GTA CTG CGC AGC CTT) بودند (8).

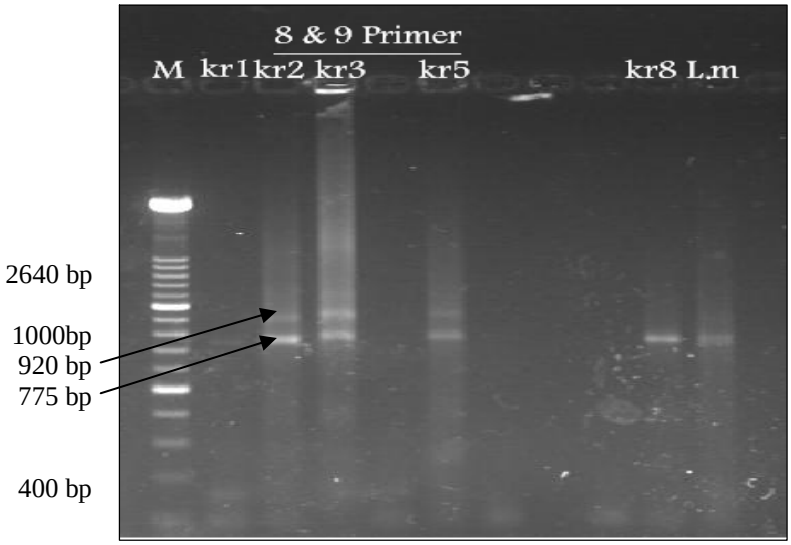
یافته‌ها

در این مطالعه با استفاده از پرایمرهای مورد استفاده، برای هر گونه، حداقل سه باند براساس هر پرایمر شناسایی شد. با استفاده از پرایمر Ab1-01 باندهایی با وزن تقریبی **500**، **600**، **900** و **1500** جفت باز که معرف لیشمانیا ماژورهستند، تشکیل گردید.

برای تأیید هویت انگل‌های لیشمانیا از پرایمرهای CB1 و CB2 که بر اساس ژن Kinetoplastid membrane protein (KMP) لیشمانیا طراحی شده‌اند، نیز استفاده گردید. این ناحیه در انگل‌های لیشمانیا و ویانیا بسیار باثبات بوده و در تمامی گونه‌های لیشمانیا ملاحظه می‌شود. باند **270** در این انگل‌ها مشترک است و مشاهده آن می‌تواند معرف انگل لیشمانیا باشد. باند **536** و **800** نیز برای لیشمانیا ماژور اختصاصی است، که در همه هفت نمونه مورد مطالعه مشاهده شد. همچنین از دو پرایمر دیگر که بر اساس ژن 16S r RNA لیشمانیاها طراحی شده‌اند (TCG CAG AAC GCC CCT ACC و AGG GGT TGG TGT AAA ATA GGC) و در L.m دو باند اختصاصی، یکی به وزن **775** و دیگری به وزن **920** جفت باز را ایجاد می‌نمایند، استفاده گردید. در لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا اینفنتوم این دو باند تشکیل نمی‌شوند (8). در شکل **1** نمونه‌ای از سیمای الکتروفورتیک (finger print) محصول RAPD-PCR مربوط به چند ایزوله لیشمانیای جداشده از بیماران مبتلا به سالک در شهرکرمانشاه که با استفاده از پرایمرهای ژن 16S r RNA تهیه شده است، مشاهده می‌گردد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل 1- تصویر الگوی الکتروفورتیک محصول RAPD-PCR به‌دست‌آمده از چهار سوش لیشمانیای جداشده از بیماران مبتلا به سالک کرمانشاه با استفاده از پرایمرهای ژن 16S r RNA (M :مارکر L.m: لیشمانیا ماژور kr: ایزوله های کرمانشاه)

بدین‌ترتیب تمامی هفت ایزوله مورد بررسی در این مطالعه به‌عنوان لیشمانیا ماژور شناسایی شدند.

بحث

روش RAPD-PCR در مطالعات متعددی برای تعیین گونه انگل و حتی برای تعیین تفاوت‌های ژنتیکی بین گونه‌های مختلف استفاده شده است. شریفی و اردهالی در شهر بم، عامل بیماری را از مبتلایان به سالک، جدا نموده و با روش PCR تعیین گونه کردند. آن‌ها در این مطالعه، گونه لیشمانیا ماژور را جداسازی و به‌عنوان عامل بیماری معرفی نمودند (5).

حمزوی و همکاران نیز در استان بوشهر از بیماران مبتلا به سالک، سوش‌های انگل را جدا نموده و با روش RAPD- PCR شناسایی نمودند. عامل بیماری سالک در مناطق مورد مطالعه استان بوشهر نیز از گونه لیشمانیا ماژور بود (6).

باندهای تشکیل‌شده توسط پرایمر Ab1-01 که دارای اوزان تقریبی 500، 600، 900 و 1500 بودند، در مطالعات نویس (Noyes) و همکاران (8) و حمزوی و همکاران (6) نیز دیده شده‌اند. این باندها در سایر نقاط کشور و برخی مناطق دنیا به‌عنوان باندهای معرف لیشمانیا ماژور مشاهده شده‌اند. برای شناسایی ژنوم ناحیه 16S r RNA لیشمانیاها دو پرایمر وجود داشته که L.m دو باند اختصاصی، یکی به وزن 775 و دیگری 920 جفت باز را ایجاد می‌نماید، در حالی که در لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا اینفنتوم این باندها دیده نمی‌شوند (4، 7 و 8).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصله به‌نظر می‌رسد که لیشمانیا ماژور عامل اصلی لیشمانیوز جلدی در مناطق مختلف استان کرمانشاه باشد. انجام مطالعات دقیق، جامع و کامل در زمینه های مختلف این بیماری از جمله اپیدمیولوژی، ناقلین و مخازن احتمالی بیماری، به خصوص در مناطقی از استان که موارد بیماری بیشتر ملاحظه می‌شود، توصیه می‌گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1. Ardehali S, Rzaii R, Nadim A. [The leishmania parasites and leishmaniasis (Persian)]. 1st ed. Tehran: Tehran University Press 1994;1-25.
2. Report of WHO expert committee. Control of the leishmaniasis. Technical Report Series 1990; (793): 2-15.
3. Hatam Gh.[Characterization of leishmania parasite using electrophoresis technique (Persian)]. PhD thesis in medical parasitology. Tehran: Medical Sciences Faculty, Tarbiat Modares University 1996; 34-53.
4. Motazedian MH, Noyes H, Maingon R. Leishmania and sauroleishmania: The use of RAPD - PCR for the identification of parasites from vertebrates and invertebrates. Exp Parasitol 1996; 83(1): 150-4.
5. Sharifi I, Ardehali S, Motazedian H, Aflatonian MR, Fekri AR, Mousavi A, et al. Identification and characterization of leishmania isolates in school children in Bam, south eastern Iran. Iranian J Med science 1997; 22 (3-4): 82-8.
6. Hamzavi Y, Mohebali M, Edrissian Gh H, Foruzani AR. [Epidemiology of cutaneous leishmaniasis, human infections and animal reservoirs, in Dashti and Dashtestan districts, Bushehr province 1998(Persian)]. Behdasht Iran 2000; 25(1-4): 77-90.
7. Hajjaran H, Mohebali M, Razavi MR, Rezaei S, Kazemi B, Edrissian Gh H, et al. Identification of leishmania species isolated from human cutaneous leishmaniasis using random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR). Iranian J Pub Health 2004; 33(4): 8-15.
8. Noyes HA, Belli AA, Maingon R. Using of various RAPD-PCR primers for leishmania identification. Am J Trop Med Hyg 1996; 55(1): 98-105.
9. Hamzavi Y, Sobhi SA, Rezaei M. [Epidemiological factors of cutaneous leishmaniasis in the patients referred to health centers in Kermanshah province 2001-6(Persian)]. Behbood Journal 2009;13(2): 151-61.
10. Evans D. Handbook on isolation, characterization and cryopreservation of leishmania . UNDP World Bank. WHO 1989; 12-8.

www.SID.ir