

## شناسایی گونه‌های لیشمانیای جداسازی شده از بیماران مبتلا به سالک در کرمانشاه با روش RAPD-PCR

یزدان حمزوی<sup>1\*</sup>؛ بیژن نعمان‌پور<sup>2</sup>؛ علی گرگین کرچی<sup>3</sup>

### 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 لیتومونادها 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، بلوار طاق بستان، خیابان دانشگاه، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، تلفن: 0831-4274622

Email: yhamzavi@kums.ac.ir

### مقدمه

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 (4-7).

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

ایران یکی از مهم‌ترین 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

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 (GTA AAA CGA CGG) M13، (GGT GAC GCA G) Cb1 (GG GTT GGT GTA A)، Cb2 (GCC ACC ACG TAC GAG GAG) و CbA (CCA GT ATG) (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 لیسمانیا ماژورهستند، تشکیل گردید.

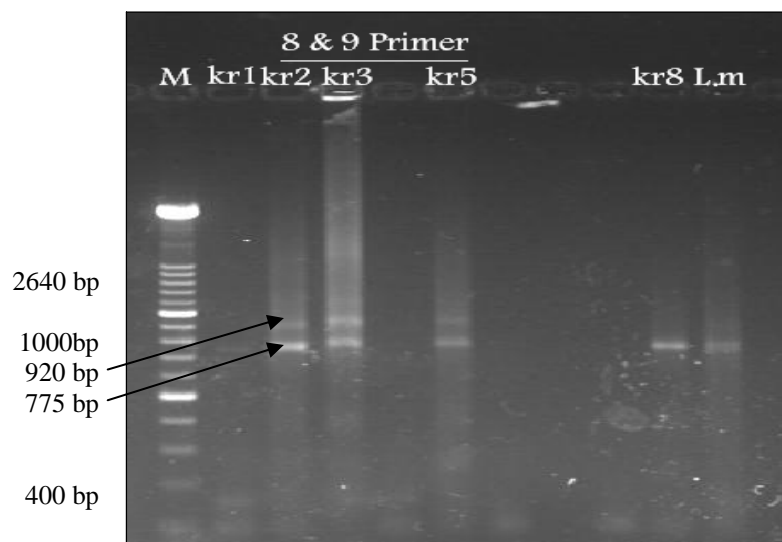
برای تأیید هویت انگل‌های لیسمانیا از پرایمرهای CB1 و CB2 که بر اساس ژن Kinetoplastid membrane protein (KMP) لیسمانیا طراحی شده‌اند، نیز استفاده گردید. این ناحیه در انگل‌های لیسمانیا و ویانیا بسیار باثبات بوده و در تمامی گونه‌های لیسمانیا ملاحظه می‌شود. باند 270 در این انگل‌ها مشترک است و مشاهده آن می‌تواند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

بیماری، بالقوه امکان اپیدمی 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 لیسمانیوز 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 بیماران که از مناطق مختلف استان کرمانشاه به منظور 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 تهیه شده 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 لیسمن مورد بررسی میکروسکوپی قرار می‌گرفتند. همچنین از سرورزیده 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 بیماران که هیچ‌گونه سابقه‌ای از مسافرت به خارج از استان را نداشتند، وارد مطالعه شده و بقیه موارد از مطالعه خارج شدند.

نمونه‌های رشد یافته در محیط NNN برای تکثیر انبوه در محیط RPMI-1640 پاساژ داده شده (10) و بعد DNA آن‌ها جدا گردید. نمونه‌های به دست آمده تا زمان آزمایش در یخچال نگهداری شدند. هفت نمونه DNA به دست آمده از ایزوله‌های جدا شده به منظور تعیین گونه با روش RAPD-PCR مورد بررسی قرار گرفتند و



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

مطالعات نویس (Noyes) و همکاران (8) و حمزوی و همکاران (6) نیز دیده شده اند. این باندها در سایر نقاط کشور و برخی مناطق دنیا به عنوان باندهای معرف لیشمانیا ماژور مشاهده شده اند. برای شناسایی ژنوم ناحیه 16S r RNA لیشمانیایها دو پرایمر وجود داشته که L.m دو باند اختصاصی، یکی به وزن 775 و دیگری 920 جفت باز را ایجاد می نماید، در حالی که در لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا اینفتوم این باندها دیده نمی شوند (4، 7 و 8).

### نتیجه گیری

با توجه به نتایج حاصله به نظر می رسد 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 می شود، توصیه می گردد.

بدین ترتیب تمامی هفت ایزوله مورد بررسی در این مطالعه به عنوان لیشمانیا ماژور شناسایی شدند.

### بحث

روش RAPD-PCR در مطالعات متعددی برای تعیین گونه انگل و حتی برای تعیین تفاوت های ژنتیکی بین گونه های 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. آن ها در این مطالعه، گونه لیشمانیا ماژور را جداسازی و به عنوان عامل بیماری معرفی نمودند (5).

حمزوی و همکاران نیز در استان بوشهر از بیماران مبتلا به سالک، سوش های 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 تشکیل شده توسط پرایمر Ab1-01 که دارای اوزان تقریبی 500، 600، 900 و 1500 بودند، در

## References

1. Ardehali S, Rzaei 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, Mohebbali 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. Hajjarian H, Mohebbali 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.