تشخیص و تعیین ژنوتایپ گونه‌های لیشمانیای جلدی در جنوب شرق ایران: آنالیز هضم آنزیمی (RFLP)

محمد خلیلی[1*]
سعید رضا نوراللهی فرد[2]

۱- گروه پاتوبیولوژی، بخش میکروبیولوژی
۲- گروه پاتوبیولوژی، بخش انگل‌شناسی
دانشگاه شهید باهنر کرمان

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۱۲/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۰۲/۱۴

چکیده

زمینه و هدف: لیشمانیوز جلدی بیماری زئونوزی بوده که عامل آن لیشمانیا ماژور و لیشمانیا تروپیکا می‌باشد. در این مطالعه به‌منظور تشخیص گونه‌های لیشمانیا در کانون‌های لیشمانیوز جلدی در جنوب شرق ایران از روش RFLP استفاده شده است. ***روش بررسی:*** بدین منظور تعداد ۵۵ نمونه بالینی از بیماران مراجعه‌کننده به مراکز درمانی شهرستان بم و تعداد ۲۸ نمونه از شیراز جمع‌آوری گردید. پس از نمونه‌گیری از محل ضایعه، خون و پوسته‌های زخم روی کاغذهای صافی واتمن قرار داده شد. پس از خشک شدن، نمونه‌ها به‌آزمایشگاه منتقل و تا زمان استخراج اسید نوکلئیک در دمای $۴^{o}c$ نگهداری گردیدند. اسید نوکلئیک نمونه‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA جدا و در $۲۰^{o}c$- تا زمان انجام آزمایش نگهداری شد. ناحیه مشترک ۴۰۰ جفت بازی در جنس لیشمانیا (ITS1) با استفاده از پرایمرهای مشترک جنس لیشمانیا آمپلی فای شده و در ادامه با آنزیم HaeIII آمپلیکون هضم شده و الگوی شکسته شدن آنها در مقایسه با سوش‌های رفرانس مورد ارزیابی قرار گرفتند. ***یافته‌ها:*** نتایج حاصله نشان داد که تمامی نمونه‌های اخذ شده از شهرستان بم گونه لیشمانیا تروپیکا و از نمونه‌های شیراز تنها یک نمونه لیشمانیا ماژور و بقیه تروپیکا تشخیص داده شد. این امر قابل تفسیر می‌باشد چرا که لیشمانیوز پوستی ایجاد شده توسط لیشمانیا تروپیکا ناشی از مخازن شهری انگل (سگ و سگ سانان) می‌باشد. ***نتیجه‌گیری:*** نتایج به‌دست آمده با توجه به نوع زخم و تاریخچه بیماران که از مناطق شهری مراجعه نموده قابل تفسیر می‌باشد. ضمن آنکه روش RFLP تکنیکی با حساسیت و ویژگی بالا بوده و می‌تواند در یک روز کاری علاوه بر تشخیص لیشمانیوز، نوع گونه را مشخص نماید.

کلمات کلیدی: لیشمانیوز جلدی، RFLP، بم، شیراز.

[*] نویسنده مسئول: کرمان، دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی، بخش میکروب شناسی تلفن: ۰۳۴۱۳۲۲۲۰۴۷
email: mdkhalily@mail.uk.ac.ir

مقدمه

بیماری لیشمانیوز (سالک) (Leishmaniasis) یکی از بیماری‌های مهم در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری می‌باشد. شناخت گونه‌های عامل بیماری به‌منظور برنامه‌ریزی جهت کنترل، پیشگیری و درمان اهمیت بسزایی دارد. روش‌های کلاسیک تشخیص انگل و شناسایی گونه شامل ارزیابی مستقیم، تهیه کشت و روش‌های بیوشیمیایی است که از معایب این روش‌ها می‌توان به حساسیت کم و وقت‌گیربودن آنها اشاره کرد. تشخیص گونه انگل نه تنها به دلایل اپیدمیولوژیک بلکه به دلایل بالینی نیز حایز اهمیت است. در ابتدا گونه انگل بر اساس انتشار جغرافیایی و تظاهرات بالینی بیماری و همچنین اپیدمیولوژی، پشه خاکی ناقل یا حیوانات مخزن تقسیم‌بندی می‌شد.[1] در حدود بیست و سه گونه مختلف از انگل لیشمانیا در دنیا شناسایی شده است؛ در ایران تنها سه گونه وجود دارد که از نظر الگوی بیماری‌زایی، کاملاً متفاوت می‌باشند. تشخیص لیشمانیوز می‌تواند بر اساس یافته‌های بالینی و اپیدمیولوژیکی صورت گیرد ولی باید برای جلوگیری از اشتباه در تشخیص با نشان دادن انگل، تائید صورت گیرد.[2] به‌دلیل تفاوت گونه‌های لیشمانیا در میزان حدت و پاسخ به رژیم‌های درمانی مختلف، تشخیص صحیح به‌منظور تعیین پیشگویی‌های بالینی و تجویز رژیم درمانی مناسب و اختصاصی، تشخیص گونه ضروری می‌باشد.[3] امروزه جهت شناخت گونه‌های انگل از روش‌های نوین مولکولی نظیر RFLP، Real Time PCR و غیره استفاده می‌شود. از جمله مزایای روش‌های مولکولی می‌توان در نیاز به میزان کم از ماده وراثتی، عدم تاثیر شرایط مخدوش‌کننده محیط و میزبان و قابلیت بررسی تعداد زیادی نمونه در یک زمان کوتاه و

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-10]

حساسیت بالای تست اشاره نمود.[۴] هدف از این مطالعه استفاده از روش PCR برای تشخیص جنس لیشمانیا و به‌دنبال آن روش RFLP جهت ژنوتایپینگ نمونه‌های مثبت در جنوب شرق ایران بود.

روش بررسی

در یک مطالعه مقطعی تعداد ۸۳ نمونه از افراد مشکوک به لیشمانیوز پوستی مراجعه‌کننده به مراکز بهداشتی از شهرستان بم و شیراز جمع‌آوری گردید و پس از تائید به روش پارازیتولوژیک نمونه‌گیری انجام شد. جهت نمونه‌گیری با استفاده از اسکالپل استریل یک تا دو قطره خون به‌همراه پوسته‌ها از محل زخم کنده و روی کاغذهای واتمن قرار داده و مشخصات بیمار از قبیل سن، جنس، محل ضایعه و محل سکونت ثبت و پس از خشک شدن به‌طور مجزا به‌طوری‌که با سایر نمونه‌ها تماس نداشته باشد به آزمایشگاه ارسال و تا زمان استخراج اسید نوکلئیک در ۴^{oc} نگهداری گردید.

تهیه سوش‌های رفرانس: سوش‌های رفرانس *لیشمانیا تروپیکا* (MHOM/SU/7U/K2Z) و *لیشمانیا ماژور* (MHOM/SU/73.5/ASKH) از موسسه پاستور تهران تهیه و در محیط‌های کشت NNN و RPMI-1640 (Sigma, Dorset, UK) تکثیر گردید.

استخراج اسید نوکلئیک انگل لیشمانیا: در این مطالعه DNA نمونه‌های مشکوک ابتدا با پانچ از روی کاغذ بریده و در داخل میکروتیوب قرار گرفت. سپس طبق توصیه کیت Accuprep (Bioneer، کره جنوبی) مقدار ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K به هر میکروتیوب افزوده شد سپس نمونه‌ها به‌مدت سه ساعت در دمای ۶۰^{oc} حرارت داده و طی این مدت هر یک ساعت یک‌بار به‌خوبی ورتکس شدند. ادامه روند استخراج اسید نوکلئیک به توصیه شرکت سازنده کیت انجام گرفت. برای اطمینان از عدم آلودگی به ازای هر ۱۰ نمونه تست، از یک نمونه کاغذ واتمن سفید عاری از نمونه، استخراج به‌عمل آمد تا از هر گونه آلودگی در حین استخراج اجتناب شود.

روش PCR: ابتدا با پرایمرهای اختصاصی منتشر شده جنس لیشمانیا با سکانس پرایمر LITSR (5'-CTG GAT CAT TTT CCG ATG-3'-), L5.8S (5'-TAG TAC CAC TTA TCG CAC TT-3') قطعه‌ای نزدیک به bp ۴۰۰ از گونه‌های مختلف لیشمانیا آمپلیفای گردید[۵] ضمن اینکه اختصاصی بودن پرایمرها در سایت Blast کنترل گردید. در نهایت بهترین شرایط از نظر میزان $MgCl_2$، غلظت پرایمرها و دمای آنلینگ به نحوی انتخاب شد تا بتواند در سوش‌های رفرانس *لیشمانیا تروپیکا* و *لیشمانیا ماژور* باندی نزدیک به ۴۰۰bp ایجاد نماید.[۵]

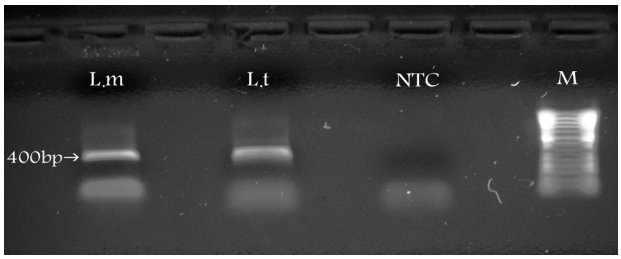
بهینه‌سازی و انجام روش RFLP: پس از آمپلی فای شدن قطعه ۴۰۰ جفت بازی با استفاده از آنزیم محدود کننده HaeIII (Fermentase، لیتوانی) تست RFLP انجام گردید.

انجام PCR و RFLP: ابتدا Master mix زیر شامل: Taq polymerase به‌میزان ۰/۲ میکرولیتر، بافر ۱۰X ۲/۵ میکرولیتر، dNTPs ۱۰ میلی‌مولار به‌میزان ۰/۲ میکرولیتر، MgCl2 (۵۰ میلی‌مولار) به‌میزان یک میکرولیتر، پرایمرهای F,R به غلظت ۱۰ پیکومول از هر کدام یک میکرولیتر و DNA استخراج شده ۲/۵ میکرولیتر تهیه و در نهایت حجم نهایی با آب مقطر استریل به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. در ادامه نمونه‌ها داخل ترمال سایکلر Mj (US, BioRad) قرار داده شد و سیکل‌های زیر برنامه‌ریزی شد. مرحله پیش دناتوراسیون ۹۵ درجه به‌مدت سه دقیقه، ۳۵ سیکل از: دناتوراسیون ۹۴ درجه به‌مدت ۴۵ ثانیه، آنلینگ ۵۰ درجه به‌مدت ۴۵ ثانیه و مرحله گستردگی پرایمرها ۷۲ درجه به‌مدت ۹۰ ثانیه انجام شد. سپس نمونه‌ها به‌همراه کنترل مثبت و منفی روی ژل آگاروز حاوی ۰/۵ میکروگرم اتیدیوم برماید به ازای هر میلی‌لیتر ژل، الکتروفورز شدند (شکل ۱). برای نمونه‌های مثبت، ۱۵µl از آمپلیکون با آنزیم HaeIII (فرمنتاس، لیتوانی) در دمای ۳۷ درجه در دو ساعت شکسته شدند و مجدداً برای تشخیص گونه لیشمانیا روی ژل الکتروفورز برده شدند (RFLP) (شکل ۲).

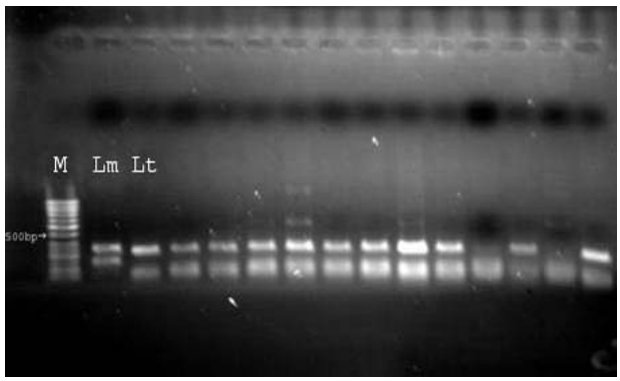
یافته‌ها

محصولات حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی نمونه‌ها ابتدائاً روی ژل آگاروز برده شدند و تمامی نمونه‌ها که با روش پارازیتولوژیکی انتخاب شده بودند، همگی نمونه‌ها (۸۳ نمونه) به‌همراه کنترل‌های مثبت باند ۴۰۰ جفت بازی داشتند و تمامی کنترل‌های منفی (اعم از کنترل PCR و کنترل استخراج اسید نوکلئیک هیچ باندی که حاکی از آلودگی باشد مشاهده نگردید) سپس جهت تشخیص گونه لیشمانیا پس از انجام تست RFLP و الکتروفورز نمونه‌ها ۱۰۰ درصد از نمونه‌های بم لیشمانیا تروپیکا تشخیص داده شد که با توجه به نوع زخم و تاریخچه بیماران که از مناطق شهری مراجعه نموده بودند. از نمونه‌های شیراز نیز همگی لیشمانیا تروپیکا بودند و فقط یک نمونه لیشمانیا ماژور تشخیص داده شد.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-10]



شکل-۱: الکتروفورز محصولات PCR سویه‌های رفرانس. M: مارکر ۵۰bp، NTC، کنترل منفی، Lm,Lt به‌ترتیب لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا ماژور



شکل-۲: الکتروفورز محصولات هضم آنزیمی. Lm,M, Lt به‌ترتیب مارکر ۵۰bp، سوش رفرانس لیشمانیا ماژور و لیشمانیا تروپیکا

بحث

قبل از ابداع روش‌های مولکولی، آنتی‌بادی‌های منوکلونال و بررسی ایزوآنزیم‌های سویه‌های مختلف، از جمله روش‌های شناسایی گونه‌های انگل لیشمانیا به‌شمار می‌رفت. اما با توجه به اینکه روش‌های مذکور وقت‌گیر و پرهزینه هستند، امروزه به‌عنوان یک روش تشخیصی متداول به‌کار نمی‌روند. روش تشخیصی دیگر که عمدتاً برای مطالعات بالینی و اپیدمیولوژیک مورد استفاده قرار می‌گیرد، تعیین منطقه جغرافیایی آلودگی (از نظر اپیدمیک یا اندمیک بودن ناحیه)، تعیین ناقل (Vector) انگل و مشخص کردن خصوصیات زخم لیشمانیوز است. امروزه روش‌های مولکولی به‌عنوان یک روش آلترناتیو در تشخیص و تایپینگ بسیاری از میکروارگانیسم‌ها جایگزین روش‌های قبلی شده است. در این مطالعه ابتدا با به‌کار بردن یک پرایمر اختصاصی و در عین حال مشترک جنس لیشمانیا، انگل فوق در نمونه‌ها با روش PCR تشخیص داده شد. در ادامه برای نمونه‌های مثبت آزمون RFLP برای تشخیص گونه انگل لیشمانیا انجام گرفت. بر حسب تفاوت در سکانس ناحیه بین رونوشت برداری (ITS) بین گونه‌های مختلف در نتیجه الگوی شکسته شدن آنها با آنزیم‌های هضم‌کننده در گونه‌های مختلف متفاوت خواهد بود. در مطالعات مختلف مولکولی نواحی مختلفی از ژنوم انگل جهت شناسایی مورد استفاده قرار گرفته است. یکی از این نواحی ITS می‌باشد که توسط Daviela و Schonian مورد استفاده قرار گرفته است. در این مطالعه نیز پرایمر اختصاصی جنس برای ناحیه مشترکی روی ITS استفاده شد و از آنزیم HaeIII جهت شکستن آمپلیکون تولید شده در PCR استفاده شد.[۵و۶] نتایج این مطالعه نشان داد که نمونه‌های به‌دست آمده از شهرستان بم و شیراز همگی گونه لیشمانیا تروپیکا بودند و فقط یک نمونه از شیراز آن‌هم با سابقه مسافرت به اصفهان و خوزستان، لیشمانیا ماژور تشخیص داده شد. در هیچکدام از نمونه‌ها نمونه میکس با دو انگل، یا الگوی متفاوتی از RFLP در مقایسه با سوش‌های رفرانس یافت نشد. اردهالی و همکاران در سال ۲۰۰۰ با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال اختصاصی و با استفاده از روش‌های IFA و ELISA توانستند ۱۵۶ ایزوله جدا شده از شیراز، کرمان و تهران را تشخیص دهند. در مقایسه با مطالعه‌ای که توسط اردهالی و همکاران با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال داشتند، نمونه‌ای در این مطالعه یافت نشد که توسط روش RFLP قابل تایپ نباشد در حالی که در روش آنتی‌بادی مونوکلونال توسط اردهالی و همکاران علاوه بر کشت و خالص‌سازی انگل که زمان‌بر بوده، برخی از سویه‌ها با آنتی‌بادی مونوکلونال به‌کار رفته واکنشی نشان ندادند.[۷] حاتم و همکاران با استفاده از روش ایزوآنزیم و با مطالعه پروفایل آنزیمی توانستند دو گونه *Leishmania major* و *Leishmania tropica* را از یکدیگر تشخیص دهند. آنها همچنین دریافتند که استفاده از روش ایزو آنزیم در مقایسه با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال اختصاصی و یا استفاده از روش ELISA بسیار قدرتمندتر می‌باشد.[۸] Marfurt در سوییس توانست‌که نمونه‌های انگل جدا شده از موارد لیشمانیوز جلدی را با استفاده از روش RFLP-PCR تشخیص دهد، همچنین نشان داد که این روش در مقایسه با روش‌های کشت آزمایشگاهی و سرولوژی از حساسیت بیشتری برخوردار است.[۴] Guizani با استفاده از روش RAPD-PCR توانست تشخیص و تفریق نمونه‌های انگل را در تونس با موفقیت انجام دهد.[۹] Lugo توانست با استفاده از روش PCR نمونه‌های لیشمانیای جلدی را در ونزوئلا تشخیص دهد، همچنین نشان داد که این روش باعث

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-10]

افزایش حساسیت در تشخیص بیماری در بیماران درمان نشده که اخیراً مبتلا شده‌اند و همچنین در موارد فاقد علائم می‌شود.[۱۰] مطالعه حاضر نشان داد که روش RFLP-PCR روشی دقیق، حساس‌و سریع برای تشخیص و ژنوتایپینگ عوامل لیشمانیای جلدی بوده و با توجه به نحوه نمونه‌گیری روی کاغذ واتمن، نیاز به کشت انگل که کاری وقت‌گیر می‌باشد بر طرف شده و امر تشخیص، سریع‌تر انجام می‌گیرد. با به‌کار بردن روش RFLP می‌توان در یک روز کاری علاوه بر تشخیص لیشمانیوز پوستی با حساسیت بالا و سهولت در امر نمونه‌گیری، گونه انگل را هم تشخیص داد. نتایج این مطالعه در تشخیص سریع و مطالعات اپیدمیولوژیکی مفید است. *سپاسگزاری:* از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید باهنر کرمان و انستیتو پاستور به‌جهت فراهم نمودن سوش‌های رفرانس لیشمانیا صمیمانه قدردانی می‌گردد.

References

1. Kubba R, AI-Gindan Y, EI-Hassan AM, Omer AH. Clinical diagnosis of cutaneous leishmaniasis (oriental sore). *J Am Acad Dermatol* 1987; 16: 1183-9.
2. Pearson RD, Sousa AQ, Jeronimo SM. Cutaneous and mucosal leishmaniasis. In: Gerald L, Mandell JE, Bennett RD, editors. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000. p. 2831-41.
3. Berman JD. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 684-703.
4. Marfurt J, Nasereddin A, Niederwieser I, Jaffe CL, Beck HP, Felger I. Identification and differentiation of Leishmania species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3147-53.
5. Schönian G, Akuffo H, Lewin S, Maasho K, Nylén S, Pratlong F, et al. Genetic variability within the species Leishmania aethiopica does not correlate with clinical variations of cutaneous leishmaniasis. *Mol Biochem Parasitol* 2000; 106: 239-48.
6. Dávila AM, Momen H. Internal-transcribed-spacer (ITS) sequences used to explore phylogenetic relationships within Leishmania. *Ann Trop Med Parasitol* 2000; 94: 651-4.
7. Ardehali S, Moattari A, Hatam GR, Hosseini SM, Sharifi I. Characterization of Leishmania isolated in Iran: 1. Serotyping with species specific monoclonal antibodies. *Acta Trop* 2000; 75: 301-7.
8. Hosseini SM, Hatam GR, Ardehali S. Characterization of Leishmania isolated from unhealed lesions caused by leishmanization. *East Mediterr Health J* 2005; 11: 240-3.
9. Ikram G, Dellagi K, Ismaïl RB. Random amplified polymorphic DNA technique for identification and differentiation of old world Leishmania species. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 66: 152-6.
10. Lugo A, Premoli-de-percoco G, Valera M. Localized cutaneous leishmaniasis using polymerase chain reaction: A Venezuelan family report. *Parsitol al Día* 1997; 21: 71-75.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-10]

Tehran University Medical Journal; Vol. 67, No. 3, Jun 2009: 168-172

Detection and genotyping of cutaneous leishmaniasis species in the southeast of Iran: restriction enzyme analysis (RFLP)

Khalili M.[1*]
Nourollahi-fard S.R.[2]

1- Department of Pathobiology, Section of Microbiology
2- Department of pathobiology, Section of Parasitology

School of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman

Received: March 11, 2009 Accepted: May 04, 2009

Abstract

Background: Leishmaniasis is a parasitic infectious disease which causes skin sores. There is no effective laboratory screening tests for leishmaniasis. Some diagnostic techniques exist that allow parasite detection and species identification by special culture and microscopy, biochemical (Isoenzymes), immunologic (immunoassays), and molecular (PCR) approaches. Specific major objectives of this study was to genotyping of *Leishmania* species in Bam and Shiraz city.
Methods: A total of 83 samples of *Leishmania* were collected from patients clinically suspected of cutaneous leishmaniasis. The geographic distributions of the samples were 55 samples from Bam and 28 from Shiraz city. For this propose samples of skin and bloods were blotted on filter paper. Genomic DNA extracted with a Genomic DNA extraction kit (AccuPrep, BIONEER). Aliquots of extracted DNA were kept at -20°C. region of ITS1 amplified with the published *Leishmania*-specific primers. 15–20mL of these amplicons, containing the amplified ITS1 region, was digested for 2h with *Hae*III.
Results: All 55 samples from Bam were considered as *L. tropica* and the positive samples from Shiraz considered as *L. tropica* and just one sample was *L. major* which was belonged to a patient had previously traveled to Isfahan and Khuzestan.
Conclusion: In the current study a PCR technique was employed for amplification of *Leishmania* DNA directly in biological materials. Characterization of genus of *Leishmania* using RFLP-PCR method is too sensitive and too rapid, and there is no need for culturing the parasite for diagnosis.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis, RFLP, Bam, Shiraz.

[*] Corresponding author: School of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, IRAN
Tel: +98-341-3222047
email: mdkhalily@mail.uk.ac.ir

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-10]