تعیین هویت انگل‌های لیشمانیای چندر شده از بیماران مبتلا به کالا آزر با روش واکنش زنجیره ای پلی مارژ در استان کهگلی و پوریاهمد

چکیده:

مقدمه و هدف: لیشمانیоз احتیاطی بیماری است که تا کالا آزر معروف می‌باشد و به وسیله گونه‌های لیشمانیایی دوولونی. این فیتوتوم به شاکاسی ایجاد می‌کند. لیشمانیوز احتیاطی در بیشتر مناطق ایران به صورت اپیدمیک و در مناطقی از استان‌های آذربایجان شرقی، فارس، بوشهر و تهران صورت آموخته است. مطالعات انجام شده مشخص نگردیده که لیشمانیوز احتیاطی در بعضی مناطق استان کهگلی و پوریاهمد وجود دارد. این مطالعه با هدف بررسی خصوصیات عامل ایجاد کننده لیشمانیوز احتیاطی از این استان انجام گرفته است.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجمیع 186 مورد مبتلا به کالا آزر استفاده شده در بخش اطفال بیمارستان امام سجاد (ع) پاسجر در سال 1389 میلادی از استان اردبیل انتخاب و در مورد کارگاه صورت گرفته چنگ آزمایشگاه انجام گرفته است. روش واکنش زنجیره ای پلی مارژ ساخت شرکت مور شرکت های انتقال و آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفته. بهترین کاربر استفاده از لیفک از محله‌های کرکه دی از اکلئوتلیاست این لیه‌لیشمانیایی در یک سری ویرایش و LINR۳ و ۵۰۱ رایانه می‌باشد.

نتیجه‌گیری: تحقیق بررسی اسپورتیف مصرفی مثبت نشان دهنده که نوع این ایشان در کالا آزر مورد بحث قرار گرفته و برای درمان بیماران جدید که نوع این بیماری را دارند به روش‌های بهتری می‌تواند کاربرد پیدا کند.

نویسنده: دکتر بهداد سرکاری

پست الکترونیک: sarkarib@yahoo.com

جدول میزان خواصعامل بالقوه این بیماری

<table>
<thead>
<tr>
<th>خاصیت</th>
<th>مقدار</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>میزان اتصال</td>
<td>۹۰ %</td>
</tr>
<tr>
<td>میزان گسترش</td>
<td>۵۰ %</td>
</tr>
<tr>
<td>میزان انتقال</td>
<td>۲۰ %</td>
</tr>
</tbody>
</table>

تاریخ و رویداد: ۱۳۸۸/۱۲/۲۳
پیشینه:

بیمارستان‌های شهر یاسوج مشخصی گردد که لیشمانیوز‌های احشایی به طور استهراکی در مناطق مختلف استان کهگیلویه و بویراحمد وجود دارد. در این مطالعه مشخصی گردد که طی یک دوره چهار ساله (1378-1382) تعداد 57 بیمار با تشخیص بیماری کالازیا در بخش اطفال بیمارستان‌های شهر یاسوج بستری گردیده‌اند که بیشترین موارد بیماری در شهر یاسوج و موارد بعدی از مناطق لوداب، زیبالی، دهدشت، دشت‌رو، مادوان، مارگون، سرا آباد، سپیدار و فیروز آباد بوده است (۲).

تاکنون مطالعه‌هایی که تعیین کننده عوامل مولد لیشمانیوز احشایی در استان کهگیلویه و بویراحمد باشد صورت نگرفته است. در مطالعه حاضر بارای اولین بار انگل لیشمانیایی جدا شده از بیماران مبتلا به لیشمانیوز احشایی در استان کهگیلویه و بویراحمد به کمک روش واکنش زنجیره‌ای پلی مار سسی نسست (۳) تعیین هورت گردد است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، 6 بیمار مبتلا به کالازیا مراجعه کننده به بخش اطفال بیمارستان امام سجاد (ع) شهر یاسوج در سال 1382 ابتدای به سیل‌های پزشک متخصص کودکان از نظر معاینات بالینی مورد

1-Leishmania donovani
2-Leishmania infantum
3-Leishmania chagasi
4-Semi – Nested Polymerase Chain Reaction (PCR)
بررسی قرار گرفتن و پس از مشکوک شدن به این

بیماران سوئیرگرای شکم، آزمایش‌های شماره‌کامل
سلول‌های خونی (۱)، ادرار و سرولوزی به منظور رد یا
تأیید بیماری درخواست شد. مهین‌نی چهار تایی
نها ی، آسیب‌رسانی مغز استخوان نیز درخواست
کرد. استمراری مستقیم مغز استخوان پس از تایت
نمونه با الکل میلی‌کل، با رنگ کیمیا رنگ‌آمیزی
کرد. در مورد کشته نیز ۲تا۳ قطره از مایع
آسیب‌رسانی مغز استخوان را در شرایط استریل وارد
می‌کرد. فازی ان و ان در اس (۳) نمونه، به مدت
۴هفته دمای ۲۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد تحت بهره
ای است. لیمار مورد مطالعه، سه بیمار دارای
جنس مذکر و سه بیمار دختر مؤنث بودند. این بیماران
ساکن روستاهای مختلف استان از جمله رستاکی
چات باریک دشت روم و چنین لوداب بودند. میانگین
گروه سنی آنها ۲۰۰۰ ماه بوده است.

جست استخراج دی از آن (۳) برای تعیین کنن

انگل در بیماران مذکور، از روش ویسی و همکاران
استفاده گردید. (۳) در این‌روش جهت استخراج
دی‌ان آسلایدهای رنگ‌آمیزی شده مغز استخوان
مربوط به بیماران مبتلا به کالآزار مورد استفاده
قرار گرفت. بودن ترتیب که ابتدا سطح لایه‌های
میکروسکوپی با تغییر سندرم جراحی تراشیده شده،
ماده به دست آمده در لوله‌های ییادورش آید و نیم
سی‌سی ریخته شد. به هر لوله ۲۰۰ میکرولیتر بافیر

1-Cell Blood Count (CBC)  
2-NNN+NS  
3-DNA  
4-Vince et al  
5-Proteinase K  
6-Vortex  
7-Minicircles
پیشینه‌ها

علایم بالینی مشاهده‌شده در این بیماران شامل حالت وحیانی نیست و بیماران حاد نیستند.

عمده گروهی از بیماران درد، شکم، با و کاشش انشعاب بوده است. آزمایش‌های خونی شامل، 

دهندگی کم‌خونی، ترومبوسپیتونی، لکوپنی، 

هیپرگلوبولینیمی و هیپروالبومینیمی (بر عکس شدن

نسبت آلبومین به گلوبرین سرم) و طبیعی بودن

آزمون‌های علائم کرده (5) بوده است. در آزمایش‌های

سرولوژی بیماران از آزمون‌های فیزیولوژی،

غیرمستقیم (3) استفاده شد. در این آزمون تیتر

آنتی‌بادی 1:128 و بالاتر با عنوان تیتر مثبت در نظر

گرفته می‌شود که تاکنون بیماران تنها در دارای عیار

آنتی‌بادی ضدبیماری‌ای با احتمال برای 1:128 و

بالاتر بودن که از نظر سروژی مثبت می‌باشد. با

بررسی اسپرم‌های مستقیم می‌توان استخوان،

استمیکروتی‌های ایجاد خون‌ریزی و تحت تعداد نسبتاً

فرایان مشاهده شد و در دو مورد از بیماران، اینک

پس از یک هفته در محیط دو فازی از این رشد نمود

و سپس در محیط های تک فازی سرم جنین کنسلاس

(4) به مدت سه هفته انتهایی


RPML 1640 درصد و

لازم برای واکنش زنجبیرهای پلی‌مرز جهت نمونه

بها حجم 25 میکرولیتر به این قرار بود: تک دی ان آ

پلی‌مرز (سلیبان - ایران) یک واحده بازه‌های

دیده‌شده نواکتین (3) 2/5 میلی مول، کلرید منیزیم

2 میلی مول. بافت واکنش زنجبیرهای پلی‌مرز (سلیبان -

ایران) 25 میکرولیتر 40 نانوگرم از پرایمرهای

LIRN 4 (5-GGGTTGCGTAAAAAGGG-3) و

مجمعه 5 میکرولیتر از ان آ مورد نظر انزیم

گرید. سنسی‌نمایه‌های آماده شده در دستگاه

تروموسایکر (تیجن و کمبریج) ساخت انگلستان) با

برنامه زیر قرار داده شدند: در مرحله اول، دمای

۴۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه در یک مرحله، در

مرحله دوم: ۱ دمای ۴۳ درجه به مدت ۲۰ ثانیه،

۲ دمای ۵۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه،

۳ دمای ۳۲ درجه به مدت ۱ دقیقه که مرحله دوم.

۴ دمای ۳۷ درجه با درجه مدت ۲ درجه در مرحله سوم، دمای ۲۲ درجه

سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه در یک مرحله بود.

پس از انجمام، واکنش زنجبیرهای پلی‌مرز

محصول به‌دست آمده بر روی زل آگاروز

۱/۵ درصد الکتروفورد شده و با پروتئین بروماید

رنگ‌آمیزی گردید. سنسی‌نمایه‌های ترانس

ایلومیانثور قرار داده شده و از زل حساسی بانده

عکس برداری گردید و با توجه به مشخص و تانی، کونه

انگل مشخص کردی.
نتایج نهایی در خصوص اپیدمیولوژی این بیماری گردیده است (7).

در مطالعه حاضر مشخصات عامل مولد بیماری کالازار در استان کهگیلویه و بویراحمد به کمک روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز تیکون که در جهت تیکونگین انگل‌های لیسهماتیا، روشهای مختلف مولکولی و بیوشیمیایی به کارگرفته شده که در این بین روشهای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز به دلیل آن که مستقیماً بر روی انگل تأکید دارد و امروزه طبقه‌بندی موجودات مختلف بر پایه خصوصیات زنتیک آنها تعیین می‌شود، دارای ارزش ویژه‌ای است. از مزایای انجام روشهای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در تشخیص کالازار می‌توان به تشخیص زودرس، حساسیت و ویژگی بالا و عدم نیاز به کشت انگل و استفاده از اسلاید‌های باکتری‌ها شده بیماران اشاره نمود. تاکنون روشهای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز به کار گرفته شده از انواع مختلفی از دی ان آ لیسهماتیا بر جهت تکثیر مورد هدف قرار داده‌اند. اما بر اساس تحقیقات انجام شده به نظر می‌رسد از بیشترین این هدف که می‌تواند بیشترین حساسیت و ویژگی را فراهم نماید تکثیر حلقه‌های کوچک دی نه آ کیتیپولاستی لیسهماتیا باشد (8). از حلقه‌های کوچک در هر سلول این لیسهماتیا تعداد فراوانی که (10 هزار کپی) موجود بوده و طول متوسط هر یک بین 700 تا

1- Leishmania tropica
2- Leishmania major

شد. جداسازی انگل از بیماران مبتلا به کالازار برای اولین بار در استان کهگیلویه و بویراحمد انجام گرفت که هم اکنون انگل‌های مذکور در تاکنون ازبین صورت کرایه تک‌هصاری می‌گردد.

برای تیکون انگل در روش ویژه‌ای زنجیره‌ای پلی‌مرز باند حاصل برای لیسهماتیا اینفانتوم و 270 جفت پاز. لیسهماتیا تروریکا (1) 60 جفت پاز و برای لیسهماتیا مازور (2) 60 جفت پاز می‌باشد.

تمام شناسایی گونه‌ها از بیماران مبتلا به کالازار مورد مطالعه در آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز باند 400 جفت پاز ایجاد نموده، مقایسه با اینندهای حاصل از شناسایی گونه‌های جدا شده این بیماران با گونه‌های استاندارد، مشخص نمود که گونه انگل مولد لیسهماتیوز احتمالی در تمام بیماران مورد مطالعه لیسهماتیا اینفانتوم می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

به طور کلی تشخیص هویت انگل‌های مولد لیسهماتیوز احتمالی از اهمیت خاصی برخوردار است. چرا که از یک طرف برای افزایش موارد ابتلا به بیماری ایدز در کشور های جهان سوم و در حال توسعه الکی بالینی بیماری پیچیده تر شده است و از طرف دیگر گزارش‌های متعددی از پاناسیا ایجاد عفونت احتمالی به وسیله سوسح های انگل لیسهماتیا تروریکا در انسان از هند، عراق، خلیج فارس (سری‌بان) آمریکایی در جنگ خلیج) و استان فارس باعث ایجاد

1- Leishmania tropica
2- Leishmania major
در مجموع نتایج این مطالعه برای اولین بار مشخص نمود که عامل مولد کالا آلارز در این استات
لیشتمایا اینفانتوم می باشد. پیشنهاد می گردد مطالعات
جامع در خصوص مخازن این بیماری انجام گردد تا
به همراه بررسی های سررایانپیوسته جنبه‌های
مختلف این بیماری در استات مشخص گردد.

۱۰۰۰ جفت نوکلتودیت می یابند. در حلکه کوچک از دو
قطعه ثابت و متفاوت تشکیل یافته که سکانس قطعه ثابت
در کوههای مختلف لیشتمایا یکسان بوده و هم از تکثیر
آن جهت تشخیص جنس لیشتمایا استفاده می شود. اما
سکانس و طول قطعه متفاوت در انواع گونه های انجک
لیشتمایا متغیر بوده ولی با تکثیر این قطعه و بر
اساس تفاوت وزن باندهای حاصل می توان گونه های
مختلف را جدا سازی نمود که پایمرهای
به کار رفته در این تحقیق تأمین LIN1 و LIN4
کننده چه تیخ خواه بود (9).

نتایج مطالعه حاضر روش‌های نمود که
عامل مولد بیماری کلا آلارز در منطقه مورد مطالعه
لیشتمایا اینفانتوم می باشد. عامل مولد لیشتمایوز
اختیاری در مطالعات انگلیش شده در سایر مناطق ایران
نیز لیشتمایا اینفانتوم گزارش گردیده است. در مطالعه
مطالعه (128) در شمال غرب ایران از
۱۱ نمونه جدیده از بیماران مبتلا به کلا آلارز، انگل
مورد نظر در تمامی موارد لیشتمایا اینفانتوم گزارش
گردیده (1). در مطالعه سبزی و همکاران (2001) در
استان بوشهر لیشتمایا اینفانتوم از سک و شغال
(خاک کالا آلارز) چند گردیده (4). در مطالعه استفاده
و همکاران (1280) بر روی لامهای بیشتر می‌...

استخوان تپه شده از مناطق مختلف استات فارس، با
روش سمی تاست و جزئیه ای پیل مراز در بیش از
۴۷ بروخ سوا معادل مولد بیماری لیشتمایا
اینفانتوم و در سرم لیشتمایا تروپیکا کازارش
گردیده است (11).
Characterization of Leishmania Parasites Isolated From Kala-azar Patients in Kohgiloyeh and Boyerahmad, Using Semi-Nested PCR

**ABSTRACT:**

**Introduction & Objective:** Visceral leishmaniasis (VL) is a disease commonly known as Kala-azar caused by protozoan parasites of the genus Leishmania including *L. donovani*, *L. infantum* and *L. chagasi*. VL is sporadic in many areas of Iran and is endemic in a few provinces such as Fars, Azarbayjan, Bushehr, Ardabil and Qom. VL has been reported from some areas of Kohgiloyeh and Boyerahmad and this study aimed to characterize the causative agent of VL in this region.

**Materials & Methods:** Bone marrow sample was obtained from 6 VL patients from children department in Imam Sajad hospital in Yasuj. DNA was extracted from the obtained samples and was checked by semi-nested PCR to determine the species of the parasite. To do that, a segment of minicircle kinetoplast DNA was amplified, using LINR4 and LIN17 primers. Products of PCR were evaluated by electrophoresis, using 1.5% agarose and stained with ethidium bromide.

**Results:** Parasitologically examination of bone marrow smears demonstrated amastigotes form of the parasite in the samples. For mass cultivation, isolated parasites were cultured in diphasic NNN followed by RPMI 1640 media. All the samples produced a 720 bp band in PCR assay. The isolates were compared with referent strains and it was revealed that all the isolates were *L. infantum*.

**Conclusion:** Findings of this study demonstrated that the causative agent of VL in Kohgiloyeh and Boyerahmad was *L. infantum*. Further study is needed to explore other aspects of VL in this region.

Sarkari B.,
Fakhar M
Ebrahimi S
Motazedian MH
Hatam GH
Kalantari M
Rezanejad H.

*Assistant Professor of Immunology, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran
**PhD Candidate in Parasitology, Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
***Assistant Professor of Pediatrics, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran
****Associate Professor of Parasitology, Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
*****MSc of Entomology, Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
******MSc of Parasitology, Shaheed Beheshti Hospital, Shiraz, Iran

**KEYWORDS:**
Leishmania,
Kala-azar,
Semi-nested PCR

Received:22/1/1385
Accepted:2/5/1385

** Corresponding author:** Sarkari B
Email:sarkarib@yahoo.com
REFERENCES:


