مقاله اصیل پژوهشی

تعیین هویت مولکولی عوامل ایجادکننده لیشمانیوز جلدی در شهرستان بیرجند

مهدی کرمیان[1]، محمدصدیق فاروقی بجد[2]، مینا همتی[3]، سید علیرضا سعادتجو[4]، درویشعلی براتی[5]

چکیده

زمینه و هدف: لیشمانیوز جلدی یا سالک، در مناطق مختلفی از ایران آندمیک است. این بیماری، در سالیان گذشته به‌صورت تک‌گیر در بیرجند دیده شده است، اما به‌نظر می‌رسد از حدود پنج سال قبل، کانونی پایدار از آن در منطقه پدید آمده باشد. مطالعه حاضر، برای تعیین گونه انگل‌های لیشمانیا در ضایعات جلدی بیماران ساکن شهرستان بیرجند انجام شده است.

روش تحقیق: در این مطالعه مقطعی، نمونه‌های ضایعات جلدی بیماران مشکوک به سالک طی ۵ سال گذشته، برابر با ۸۰ نمونه که در مرکز بهداشت شهرستان بیرجند موجود بود، مورد مطالعه قرار گرفت. بخش متغیر از DNA کینتوپلاستی انگل لیشمانیا (KDNA) و نیز بخش ITS1 از DNA ریبوزومی این انگل‌ها، توسط روش PCR تکثیر گردید و از روش PCR-RFLP، بر روی محصولات بخش ITS1 برای تعیین هویت انگل‌ها استفاده شد.

یافته‌ها: تمامی نمونه‌های با تشخیص مثبت میکروسکوپی، توسط روش PCR-RFLP بر روی قطعه ITS1 از DNA ریبوزومی تعیین گونه گردیدند، اما روش KDNA PCR توانست، تنها ۴۶ نمونه را تعیین گونه نماید. در مجموع، ۸ بیمار (۱۰٪)، مبتلا به لیشمانیاماژور و ۷۲ نفر (۹۰٪)، آلوده به لیشمانیاتروپیکا تشخیص داده شدند.

نتیجه‌گیری: روش PCR-RFLP قطعه ITS1، دارای حساسیّت کامل بوده و برای تشخیص لیشمانیوز و تعیین گونه سریع انگل‌های عامل بیماری توصیه می‌شود.

بر اساس نتایج این تحقیق هر دو فرم بیماری سالک یعنی ACL (با مخزن انسانی) ناشی از لیشمانیا تروپیکا و ZCL (دارای مخازن جانوری) منتج از لیشمانیا ماژور در بیرجند موجود است.

واژه‌های کلیدی: لیشمانیاتروپیکا، لیشمانیاماژور، PCR ، بیرجند، نمونه‌های ضایعه جلدی

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۳۹۲؛ ۲۰ (۲): ۱۸۳-۱۹۰.

دریافت: ۱۳۹۱/۱۲/۲۳ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۴/۱۲

[1] نویسنده مسؤول، استادیار انگل‌شناسی، مرکز تحقیقات هپاتیت، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران.
آدرس پستی: بیرجند- خیابان غفاری- دانشگاه علوم پزشکی بیرجند- دانشکده پزشکی
تلفن: ۰۵۶۱-۴۴۳۳۰۰۴ نمابر: ۰۵۶۱-۴۴۳۳۰۰۴ پست الکترونیکی: karamianm@yahoo.com
[2] دکترای عمومی، مرکز بهداشت شهرستان بیرجند، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران.
[3] استادیار بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران.
[4] مربی پرستاری، دانشکده پرستاری و مامایی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران.
[5] کارشناس آزمایشگاه، مرکز بهداشت شهرستان بیرجند، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران.

مقدمه

لیشمانیوز، یک بیماری عفونی است که در اثر خونخواری پشه‌خاکی‌های جنس فلبوتوموس در دنیای قدیم و لوتزومیا در دنیای جدید، به انسان منتقل می‌شود.

ایران یکی از ۱۰ کشور در جهان است که بیشترین موارد بیماری لیشمانیوز جلدی در آن گزارش می‌گردد (۱).

عامل اصلی ایجاد فرم زئونوز بیماری (ZCL) در ایران، انگل لیشمانیاماژور (*Leishmania major*) بوده که دارای مخازن متعدّد جانوری به‌ویژه انواع جوندگان است (۲)؛ از طرف دیگر لیشمانیا تروپیکا (*L. tropica*)، گونه‌ای است که عامل عمده فرم با مخزن انسانی بیماری (ACL) در ایران و بسیاری از کشورهای دیگر است. البته مواردی از لیشمانیوز احشائی ایجادشده به‌وسیله این دو انگل، از ایران گزارش گردیده‌اند (۳، ۴)؛ در مقابل، لیشمانیااینفانتوم که عامل اصلی لیشمانیوز احشائی در ایران محسوب می‌شود، در بسیاری از کشورهای اروپایی، تنها، فرم لیشمانیوز جلدی را پدید آورده و مواردی از سالک ناشی از آن در ایران هم گزارش گردیده است (۵).

اهمیت تعیین هویت انگل‌های عامل ایجاد لیشمانیوز و تأثیری که در پیشگیری، کنترل و درمان بیماری دارد، سبب گردیده است که روش‌های مختلفی برای تمایز گونه این انگل‌ها به کار گرفته شود، از جمله: روش کشت انگل، تزریق به حیوان آزمایشگاهی، روش ایزوآنزیم و روش‌های مولکولی (۶). از جمله کاربردی‌ترین روش‌های مولکولی، روش PCR است که دارای حساسیّت و اختصاصیّت قابل توجه می‌باشد (۷). با استفاده از این تکنیک، می‌توان حتی با استفاده از نمونه‌های رنگ‌آمیزی‌شده با گیمسای بیماران مبتلا به سالک، گونه انگل‌های عامل بیماری را تعیین نمود. این نمونه‌های اسمیر مستقیم از افراد مشکوک به لیشمانیوز جلدی، به سهولت تهیه گردیده و برای آزمایش PCR، تا سال‌های متمادی قابل استفاده خواهند بود (۸).

دو قطعه ژنومی از انگل لیشمانیا که بیشترین کاربرد را در مطالعات مولکولی دارند شامل: DNA کینتوپلاستی انگل و بخش ITS از DNA ریبوزومی آن است (۹). DNA کینتوپلاستی، با دارابودن هزاران نسخه DNA حلقوی (minicircles) که هر یک شامل دو بخش conserve و variable است، هدف خوبی برای مطالعات مولکولی تشخیصی و تعیین گونه می‌باشد؛ از سوی دیگر، بخش ITS[1] به‌واسطه کپی‌های متعدد آن در ژنوم انگل و توالی‌های تکراری، کاربرد فراوانی برای تاکسونومی دارد.

در سالیان گذشته، بیماری سالک به‌صورت تک‌گیر در مناطقی از بیرجند مشاهده شده و تصوّر بر این بوده است که بیماری، به‌صورت وارداتی، تنها در مسافران به مناطق لیشمانیاخیز دیده می‌شود. اما یافته‌های سالیان اخیر، حاکی از ظهور کانونی پایدار از بیماری در بیرجند بوده و هر ساله موارد متعدّدی از آن در ساکنین بومی شهر بیرجند گزارش می‌گردد.

میزان بروز بیماری سالک در بیرجند طی ۵ سال گذشته، با توجه به موارد مثبت گزارش‌شده توسط مرکز بهداشت شهرستان بیرجند، ۲۱۲ نفر بوده است. هدف از مطالعه حاضر، تعیین گونه انگل‌های لیشمانیا که طی ۵ سال اخیر سبب بیماری سالک در ساکنین شهر بیرجند شده‌اند، با استفاده از روش‌های مولکولی بوده است.

روش تحقیق

نمونه‌ها

در این مطالعه، کلیّه نمونه‌های مستقیم تهیه‌شده از ضایعات جلدی افراد مشکوک به لیشمانیوز جلدی که در فاصله سال‌های ۱۳۸۷ الی ۱۳۹۱، به مرکز بهداشت شهرستان بیرجند مراجعه کرده و نتیجه بررسی میکروسکوپی آنها مثبت ذکر شده بود، در مجموع برابر با ۱۲۰ نمونه، مورد بررسی قرار گرفتند. اطلاعات بیماران، بر اساس فرم بررسی انفرادی بیماری که در مرکز بهداشت برای تمام بیماران تکمیل شده بود، استخراج گردید.

[1] *Internal Transcribed Spacer*

بیمارانی که مشخصات آنها به‌درستی ثبت نگردیده بود، از مطالعه حذف شدند. اسمیرهای رنگ آمیزی‌شده، توسط میکروسکوپ نوری مشاهده گردید و وجود جسم لیشمان در آنها مورد بررسی قرار گرفت. در مجموع، ۸۰ اسمیر مستقیم با رنگ‌آمیزی گیمسا و تشخیص میکروسکوپی مثبت، ۳۰ اسمیر منفی از نظر تشخیص میکروسکوپی مربوط به افراد مشکوک به سالک و ۱۰ اسمیر متعلّق به سایر بیماری‌های جلدی غیر از سالک، مورد مطالعه قرار گرفتند.

استخراج DNA

ابتدا سطح هر نمونه، توسط تیغه جراحی مجزا تراشیده شد و تحت شرایط استریل، به میکروتیوب منتقل گردید. استخراج DNA از این نمونه‌ها، با استفاده از کیت استخراج DNA به روش ستونی (AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit, Bioneer, South Korea) طبق دستورالعمل مندرج در کیت انجام گردید؛ بدین ترتیب که ابتدا به هر میکروتیوب، ۲۰۰ میکرولیتر بافر هضم‌کننده حاوی پروتئیناز K افزوده گردید و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند؛ سپس Binding buffer افزوده شد و پس از سانتریفوژ با دور بالا و اضافه‌نمودن ایزوپروپانول و پیپتینگ، محتویات لوله‌ها به تیوب‌های واجد فیلتر ستونی انتقال یافتند. پس از دو بار شستشو با بافرهای اختصاصی و سانتریفوژ با دور بالا، ستون‌ها به میکروتیوب‌های استریل منتقل گردید و با افزودن ۲۰۰ میکرولیتر بافر TE و حل‌شدن DNA نمونه‌ها در این بافر، محلول نهایی به کمک سانتریفوژ در میکروتیوب‌ها جمع‌آوری گردید و به‌عنوان محلول DNA در PCR استفاده گردید. محلول‌های DNA پس از استفاده، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

روش‌های PCR و PCR-RFLP[1]

محلول DNA به‌دست‌آمده، برای دو فرآیند PCR استفاده شد. ابتدا PCR اختصاصی، با استفاده از پرایمرهای LINR4 و LIN17 که قسمت متغیر از minicircleهای DNA کینتوپلاستی لیشمانیا را تکثیر می‌دهند، انجام گردید (۸). طول این قطعه، در انواع مختلف لیشمانیا متفاوت بود و با توجه به طول حرکت باند، طیّ الکتروفورز بر ژل آگاروز گونه لیشمانیای مربوط به هر ایزوله شناسایی گردید. طول این قطعه در مورد لیشمانیا ترویپکا در حدود ۷۵۰ جفت باز و در لیشمانیا ماژور ۶۸۰ جفت باز است.

در روش PCR دوم، با استفاده از پرایمرهای L5.8S و LITSR، بخشی از DNA ریبوزومی 5.8S و نیز کلّ قطعه ITS1 ریبوزومی در انگل‌های لیشمانیای مورد بررسی، تکثیر یافتند (۱۱). طول این قطعه در انواع مختلف لیشمانیا، در حدود 300bp است. در این شرایط، برای تفکیک انواع مختلف لیشمانیا، از تکنیک PCR-RFLP با استفاده آنزیم BsuRI (Fermentas, Lithuania) که ایزوشیزومری از آنزیم محدودکننده HaeIII است، استفاده گردید (۱۲). الگوی هضم DNA توسط این آنزیم، در مورد انواع مختلف لیشمانیا از جمله لیشمانیا ماژور و لیشمانیا ترویپکا متفاوت بود و بر اساس الکتروفورز محصول بر روی ژل آگاروز، انواع مختلف انگل جداسازی شدند.

برای PCR نمونه‌ها، از دستگاه Eppendorf Thermal Cycler (Mastercycler EP Gradient S, Germany) و برای الکتروفورز افقی نمونه‌ها از دستگاه ژل الکتروفورزیس ساخت شرکت Biometra آلمان استفاده شد. ایزوله‌های استاندارد بکاررفته برای مقایسه باندهای نمونه‌های PCRشده شامل: MHOM/SU/71/K27 ایزوله استاندارد لیشمانیاتروپیکا و MHOM/SU/73/5ASKH ایزوله استاندارد لیشمانیاماژور بودند. مارکر مورد استفاده برای الکتروفورز افقی Mid Range DNA Ladder (100bp-3kb) ساخت شرکت Jena Bioscience آلمان بود.

DNA Sequencing

برای تأیید تشخیص گونه‌ای، تعدادی از نمونه‌های تکثیریافته توسط پرایمرهای L5.8S و LITSR به‌صورت

[1] *Restriction Fragment Length Polymorphism*

دوطرفه و توسط همین دو پرایمر، توسط کمپانی Bioneer کشور کره جنوبی تعیین توالی گردیدند. نتایج sequencing توسط نرم‌افزارهای ChromasPro v.1.7.4 و Bioedit 7.0.9 بررسی شد و هم‌ردیفی در مورد توالی‌های دوطرفه انجام گردید. نتایج به‌دست‌آمده، با اطلاعات موجود در بانک ژنی NCBI مقایسه و ثبت گردیدند.

تجزیه و تحلیل اطلاعات به‌دست‌آمده از بررسی پرونده بیماران و نتایج تعیین گونه‌ای، با استفاده از نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۱۳) و با استفاده از آمار توصیفی و آزمون‌های آماری کای‌اسکوئر و تست دقیق فیشر در سطح α=۰/۰۵ آنالیز گردید.

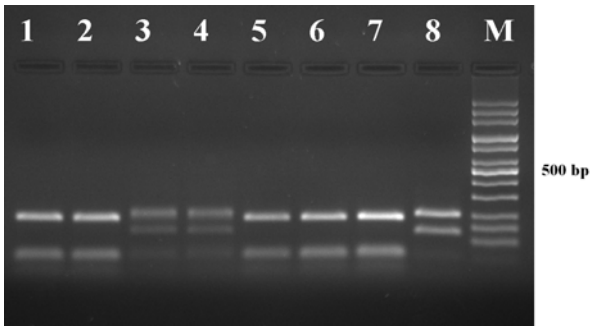
یافته‌ها

روش PCR اختصاصی برای تکثیر قطعه ITS1 انگل‌های لیشمانیا، در مورد تمام ۸۰ نمونه مثبت میکروسکوپی (۱۰۰٪) و نیز ۱۳ نمونه از ۳۰ نمونه منفی از نظر تشخیص میکروسکوپی (۴۳/۳٪)، باند اختصاصی ایجاد نمود و در نمونه‌های مربوط به سایر بیماری‌های جلدی، باندی ایجاد نکرد. با اثردادن آنزیم BsuRI بر روی محصولات حاصل از این روش PCR و مقایسه الگوی باندی ایجادشده با استانداردهای مربوط به انواع مختلف لیشمانیا، گونه‌های آلوده‌کننده انگل در بیماران مشخص گردیدند (تصویر ۱). اما روش PCR تکثیردهنده KDNA انگل‌ها، تنها در مورد ۴۶ نمونه، پس از الکتروفورز بر ژل آگاروز، باند اختصاصی ایجاد کرد (۵۷/۵٪) و قادر به تعیین گونه آنها بود (تصویر ۲).

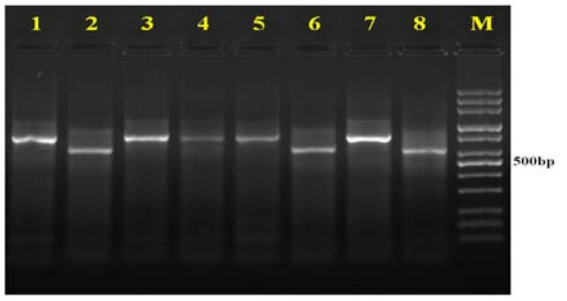
از مجموع ۸۰ نمونه میکروسکوپی مثبت مورد بررسی، ۸ بیمار، مبتلا به لیشمانیاماژور تشخیص داده شدند (۱۰٪) و ۷۲ بیمار دیگر به لیشمانیاتروپیکا مبتلا بودند (۹۰٪).

در مقایسه عوارض کلینیکی ایجادشده در بیماران با گونه انگل عامل بیماری (جدول ۱)، تفاوت معنی‌داری بین دو گونه انگل مشاهده نگردید؛ از سوی دیگر، مقایسه زمان مراجعه به پزشک با سابقه ظهور ضایعه در بیماران مبتلا به لیشمانیاماژور، نشان داد که کلیّه این بیماران، در محدوده ماه‌های مرداد تا مهر، مورد گزش پشه‌خاکی آلوده به انگل قرار گرفته‌اند؛ در حالی‌که در مورد افراد مبتلا به لیشمانیاتروپیکا، گزش پشه آلوده در تمام ماه‌های سال اتفاق افتاده است.

نتایج DNA Sequencing قطعه ITS1 مربوط به ۲۰ بیمار، صحّت تعیین گونه توسط روش PCR-RFLP مربوط به این قطعات را تأیید نمود. توالی نوکلئوتیدی این قطعات، در بانک ژنی NCBI آمریکا با کدهای شناسایی KC505421 الی KC505440 ثبت گردیده و قابل دسترسی است.



تصویر ۱- الکتروفورزیس محصولات هضم آنزیمی بخش ITS1 از DNA ریبوزومی انگل‌های لیشمانیا توسط آنزیم HaeIII بر روی ژل آگاروز. ردیف ۱ تا ۶ نمونه‌های ضایعات جلدی بیماران. ردیف ۷ و ۸ به‌ترتیب ایزوله استاندارد لیشمانیاتروپیکا و لیشمانیاماژور. ردیف M مارکر وزنی DNA (100-3000bp) شرکت Jena Bioscience آلمان.



تصویر ۲- الکتروفورزیس محصولات PCR بخش متغیر KDNA انگل‌های لیشمانیا بر روی ژل آگاروز. ردیف ۱ تا ۶ نمونه‌های ضایعات جلدی بیماران. ردیف ۷ و ۸ به‌ترتیب ایزوله استاندارد لیشمانیاتروپیکا و لیشمانیاماژور. ردیف M مارکر وزنی DNA (100-3000bp) شرکت Jena Bioscience آلمان

جدول ۱- فراوانی مطلق و نسبی گونه های مختلف عامل بیماری با توجه به اطلاعات کلینیکی بدست آمده از بیماران

نام متغیر	زیر گروه	لیشمانیاماژور (درصد) فراوانی	لیشمانیاتروپیکا (درصد) فراوانی	سطح معنی‌داری آزمون دقیق فیشر
جنسیّت	مرد	۴ (۵۰)	۲۹ (۴۶/۸)	۱
	زن	۴ (۵۰)	۳۳ (۵۳/۲)	
محل سکونت	شهر	۶ (۷۵)	۵۱ (۷۰/۸)	۱
	روستا	۲ (۲۵)	۲۱ (۲۹/۲)	
تعداد ضایعه جلدی	۱-۲	۴ (۵۰)	۵۸ (۸۰/۶)	۰/۰۷
	≥۳	۴ (۵۰)	۱۴ (۱۹/۴)	
محل ضایعه	صورت و گردن	۱ (۱۲/۵)	۱۹ (۲۶/۴)	۰/۸۱
	دست و پا	۷ (۸۷/۵)	۴۸ (۶۶/۷)	
	هر دو	–	۵ (۶/۹)	
طول دوره بروز ضایعه (ماه)	۱-۲	۵ (۶۲/۵)	۲۷ (۳۷/۵)	۰/۴۱
	۳-۶	۲ (۲۵)	۳۴ (۴۷/۲)	
	>۶	۱ (۱۲/۵)	۱۱ (۱۵/۳)	

بحث

مطالعه حاضر با هدف تعیین هویت انگل‌های عامل ایجاد لیشمانیوز جلدی در شهرستان بیرجند انجام گردید.

کاربرد روش PCR-RFLP با استفاده از قطعه ITS1 از DNA ریبوزومی انگل، قادر به تعیین گونه انگل در تمامی نمونه‌های آزمایشگاهی بود و نیز در ۱۳ نمونه از ۳۰ اسمیر میکروسکوپی افراد مشکوک به لیشمانیوز نیز گونه انگل‌های عامل بیماری را مشخص نمود.

در سال ۲۰۰۷، Kumar و همکاران با کاربرد این روش توانسته بودند، ۸۲/۷۵٪ انگل‌های موجود در نمونه‌های کلینیکی بیماران را تعیین گونه نمایند (۱۳)؛ اما استفاده از این روش توسط El-Beshbishy و همکاران، در تعیین گونه انگل‌های جداشده از ضایعات جلدی بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی در عربستان، تنها ۷۰/۱٪ توانسته است مؤثّر باشد (۱۴).

اختلاف بین نتایج تحقیق حاضر با مطالعات ذکرشده، می‌تواند ناشی از تفاوت بین نمونه‌های کلینیکی، نحوه استخراج DNA و شرایط انجام PCR باشد.

در عین حال، در تحقیق حاضر از مجموع ۳۰ نمونه مربوط به افراد مشکوک به لیشمانیوز جلدی که در آزمایش مستقیم میکروسکوپی آنها، انگلی تشخیص داده نشده بود، ۱۳ نمونه (۴۳/۳٪) توسط روش PCR-RFLP ذکرشده مثبت شد و تعیین گونه گردیدند. در تحقیق مشابهی در سال ۲۰۰۶ توسط Al-Jawabreh و همکاران بر روی افراد مشکوک به لیشمانیوز جلدی در کشور مستقل فلسطین، روش PCR ذکرشده، در مورد ۸۲٪ نمونه‌های منفی، قادر به تشخیص انگل لیشمانیا بوده است (۱۵). ذکر این نکته نیز ضروری است که در مطالعات مختلف انجام‌گرفته، حساسیّت روش مشاهده مستقیم میکروسکوپی در مورد نمونه‌های مختلف کلینیکی، بین ۴۲٪ تا ۷۶٪ ذکر گردیده است (۱۶، ۱۷) که در این بین، نمونه‌های تهیه‌شده از ضایعات جلدی بیماران، کمترین حساسیّت را دارند. برخی محققین علت این امر را پراکندگی ناهمگن اماستیگوت‌های انگل در نمونه‌های پوستی می‌دانند که باعث می‌شود در موارد متعدد، انگل گزارش نشود (۱۵). دلایل دیگری را نیز می‌توان در مورد تفاوت نتیجه مشاهده میکروسکوپی و PCR برشمرد، از جمله: خوب رنگ‌آمیزی‌نشدن نمونه‌ها و نیز شایع‌بودن میزان خوددرمانی در بیماران مبتلا به ضایعات جلدی که در مورد مبتلایان به لیشمانیوز، این درمان‌های غیراختصاصی، می‌تواند

سبب متلاشی‌شدن و تغییر شکل‌دادن انگل در بافت شده و تشخیص مورفولوژیک آن را با اشکال مواجه سازد.

در مطالعات دیگری که با استفاده از پرایمرهای بکار گرفته‌شده در این تحقیق انجام شد نیز حساسیّت این روش PCR، بیشتر از روش میکروسکوپی برآورد گردیده است (۱۸، ۱۹).

در تحقیق حاضر، با توجه به هم‌خوانی نتایج DNA sequencing با PCR-RFLP و نیز ایجاد الگوی باندی مربوط به لیشمانیا در مورد تمام نمونه‌ها، به نظر می‌رسد که PCR انجام‌شده، اختصاصی عمل کرده و احتمال پاسخ مثبت کاذب در آن بسیار کم می‌باشد. گرچه روش PCR انجام‌شده در مورد KDNA، حساسیّت به‌مراتب کمتری نسبت به روش PCR دیگر داشت، اما با توجه به تک‌مرحله‌ای‌بودن و سهولت کاربرد، می‌تواند برای تعیین گونه سریع انگل‌های لیشمانیا به‌کار رود.

بررسی همه‌گیری عوامل ایجاد بیماری در منطقه، نشان می‌دهد که زمان تقریبی آلودگی به انگل در بیماران مبتلا به لیشمانیاماژور، محدود به ماه‌های مرداد تا مهر؛ یعنی اواسط تابستان تا اوایل پاییز است که احتمالاً هماهنگ با دوره فراوانی جوندگان مخزن بیماری در منطقه می‌باشد؛ در حالی‌که در مورد بیماران مبتلا به لیشمانیاتروپیکا، در بیشتر ماه‌های سال انتقال بیماری مشاهده می‌گردد. این نتایج، در واقع تأییدکننده چرخه زئونوز بیماری ناشی از لیشمانیاماژور و نیز فرم آنتروپونوتیک سالک ناشی از لیشمانیاتروپیکا در منطقه می‌باشند؛ همچنین با توجه به عدم مشاهده تفاوت معنی‌دار از نظر درصد آلودگی به دو گونه انگل در شهر و روستا، به‌نظر می‌رسد شرایط لازم برای چرخه زئونوز و نیز انسانی بیماری در هر دو منطقه وجود دارد.

نتیجه‌گیری

استفاده از روش‌های PCR، در تعیین هویت انگل‌های عامل لیشمانیوز جلدی در این تحقیق موفقیت‌آمیز بوده و با کاربرد نمونه‌های تهیه‌شده طی چند سال گذشته، روشی عملی برآورد می‌گردد. نتیجه تحقیق، حاکی از موجودبودن هر دو فرم لیشمانیوز جلدی آنتروپونوتیک و زئونوتیک در منطقه بیرجند می‌باشد؛ لذا لازم است برای تعیین فون پشه‌خاکی‌های ناقل، میزبانان مخزن جانوری و طرح‌ریزی سیاست‌های کنترل و پیشگیری از بیماری، مطالعات بیشتری صورت گیرد.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی بیرجند با کد ۶۸۳ است. بدین‌وسیله از همکاری مسؤولین محترم مرکز بهداشت شهرستان بیرجند و معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه جناب آقای دکتر زربان، کمال تشکر را داریم.

منابع:

1- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One. 2012; 7(5): e35671.

2- Mirzaei A, Rouhani S, Taherkhani H, Farahmand M, Kazemi B, Hedayati M, et al. Isolation and detection of Leishmania species among naturally infected Rhombomis opimus, a reservoir host of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Turkemen Sahara, North East of Iran. Exp Parasitol. 2011; 129(4): 375-80

3- Alborzi A, Pouladfar GR, Fakhar M, Motazedian MH, Hatam GR, Kadivar MR. Isolation of Leishmania tropica from a patient with visceral leishmaniasis and disseminated cutaneous leishmaniasis, southern Iran. Am J Trop Med Hyg. 2008; 79(3): 435-7.

4- Karamian M, Motazedian MH, Mehrabani D, Gholami K. Leishmania major infection in a patient with visceral leishmaniasis: treatment with Amphotericin B. Parasitol Res. 2007; 101(5): 1431-4.

5- Hatam GR, Hosseini SM, Ardehali S. Dermotropic isolates of Leishmania infantum in Iran. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1997; 91(4): 440.

6- Goto H, Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Expert Rev Anti Infect Ther. 2010: 8(4): 419-33.

7- Schönian G, Kuhls K, Mauricio IL. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of Leishmania. Parasitology. 2011; 138(4): 405-25.

8- Motazedian H, Karamian M, Noyes HA, Ardehali S. DNA extraction and amplification of leishmania from archived, Giemsa-stained slides, for the diagnosis of cutaneous Leishmaniasis by PCR. Ann Trop Med Parasitol. 2002; 96(1): 31-4.

9- Rocha MN, Margonari C, Presot IM, Soares RP. Evaluation of 4 polymerase chain reaction protocols for cultured Leishmania spp. typing. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010; 68(4): 401-9.

10- Karamian M, Motazedian MH, Fakhar M, Pakshir K, Jowkar F, Rezanezhad H. Atypical presentation of Old-World cutaneous leishmaniasis, diagnosis and species identification by PCR. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2008; 22(8): 958-62.

11- el Tai NO, Osman OF, el Fari M, Presber W, Schönian G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of Leishmania donovani spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2000; 94(5): 575-9.

12- Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, et al. PCR diagnosis and characterization of Leishmania in local and imported clinical samples. Diagn Microbiol Infect Dis. 2003; 47(1): 349-358.

13- Kumar R, Bumb RA, Ansari NA, Mehta RD, Salotra P. Cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania tropica in Bikaner, India: parasite identification and characterization using molecular and immunologic tools. Am J Trop Med Hyg. 2007; 76(5): 896-901.

14 El-Beshbishy HA, Al-Ali KH, El-Badry AA. Molecular characterization of cutaneous leishmaniasis in Al-Madinah Al-Munawarah province, western Saudi Arabia. Int J Infect Dis. 2013; 17(5): e334-8.

15- Al-Jawabreh A, Schoenian G, Hamarsheh O, Presber W. Clinical diagnosis of cutaneous leishmaniasis: a comparison study between standardized graded direct microscopy and ITS1-PCR of Giemsa-stained smears. Acta Trop. 2006; 99(1): 55-61.

16- Aviles H, Belli A, Armijos R, Monroy FP, Harris E. PCR detection and identification of Leishmania parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. J Parasitol. 1999; 85(2):181-7.

17- Andresen K, Gaafar A, El-Hassan AM, Ismail A, Dafalla M, Theander TG, et al. Evaluation of the polymerase chain reaction in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to Leishmania major: a comparison with direct microscopy of smears and sections from lesions. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1996;90(2): 133-5.

18- Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. J Clin Microbiol. 2006; 44(4): 1435-9.

19- Dweik A, Schönian G, Mosleh IM, Karanis P. Evaluation of PCR-RFLP (based on ITS-1 and HaeIII) for the detection of Leishmania species, using Greek canine isolates and Jordanian clinical material. Ann Trop Med Parasitol. 2007; 101(5): 399-407.

Abstract *Original Article*

Molecular identification of cutaneous leishmaniasis agents in Birjand, Iran

Mehdi Karamian[1], Mohammad Sedigh Faroghi Bojd[2], Mina Hemmati[3], Seyed Alireza Sadatjoo[4], Darvish Ali Barati[5]

Background and Aim: Cutaneous leishmaniasis (CL) is an endemic disease in different areas of Iran. During past years, the disease was sporadic in Birjand. But, it seems that during recent five years a stable focal leishmaniasis has been developed in the area.

The present study was designed to determine the species of Leishmania parasites in cutaneous lesions of patients residing in the city of Birjand.

Materials and Methods: In this cross-sectional study, 80 samples of microscopically-positive slides of cutaneous lesions, belonging to suspected CL patients during the past five years, were examined. The variable kinetoplastic regions of the DNA of leishmania and ribosomal Internal Transcribed Subunit 1 (ITS1) of the parasite were multiplied by means of PCR procedure .Then, All PCR products of ITS1 were digested with HaeIII for species identification.

Results: PCR-RFLP profile of ITS1 rDNA was able to identify species of leishmania in all 80 microscopically-positive (100%) slides and 13 out of 30 (43.3%) microscopically-negative ones. But only 46 samples (57.5%) were identified by means of KDNA PCR. Among the the all subjects, 8 patients (10%) had *leishmania major* and 72 (90%)had been infected with *leishmania tropica.*

Conclusion: PCR-RFLP of ITS1 rDNA of leishmania is recommended to diagnose infection with CL agents, because of its high sensitivity.

Key Words: Leishmania tropica, Leishmania major, PCR, Birjand, Cutaneous lesion slides

Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2013; 20 (2): 183-190.

Received: March 13, 2013 Accepted: July 3, 2013

[1] *Corresponding author, assistant professor of parasitology, Hepatitis Research Center ,Faculty of Medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran karamianm@yahoo.com*
[2] *M.D. The city health center of Birjand, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran.*
[3] *Assistant professor of Biochemistry, faculty of medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran.*
[4] *Academic member of Faculty of Nursing and Midwifery, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran.*
[5] *B.S. in Laboratory Sciences, The city health center of Birjand, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran.*