Archive of SID

مقاله اصیل پژوهشی

تعیین گونه انگل‌های عامل لیشمانیازیس جلدی با روش مولکولی، در شهرستان مشهد

محمد کریمیان شیرازی[1]، غلامرضا رزمی[2]، ابوالقاسم نقیبی[3]

چکیده

زمینه و هدف: لیشمانیازیس جلدی، یکی از بیماری‌های آندمیک واجد اهمیّت بهداشتی در ایران است. تشخیص گونه‌های لیشمانیا در هر منطقه، برای کنترل بیماری ضروری است. با توجه به تشابه مورفولوژیک انگل‌های عامل لیشمانیا، لازم است از روش‌های حساس از جمله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، برای تعیین گونه‌های این انگل استفاده گردد. مطالعه حاضر، به‌منظور تعیین گونه‌های انگل لیشمانیا به روش ملکولی، در شهرستان مشهد انجام گرفت.

روش تحقیق: در این مطالعه توصیفی- مقطعی، ابتدا از ضایعات جلدی ۱۰۰ بیمار مبتلا به سالک مراجعه‌کننده به سه آزمایشگاه تشخیص طبی بیمارستان فارابی، دکتر علمداری و کلینیک سرور شهرستان مشهد از پاییز ۱۳۹۰ تا تابستان ۱۳۹۲، گسترش نسجی تهیه شد و از زخم ۲۵ نفر از آنها، کشت تک‌یاخته در محیط NNN غنی‌شده با RPMI انجام شد. نمونه‌های مثبت، برای استخراج DNA و آزمایش (PCR) استفاده شدند. در دو مرحله، آزمایش PCR انجام گرفت. در مرحله اول، از روش PCR برای تشخیص جنس لیشمانیا استفاده شد و در مرحله دوم، از روش Semi –nested PCR برای تعیین گونه‌های لیشمانیا استفاده گردید.

یافته‌ها: در مرحله اول PCR، آلودگی به جنس لیشمانیا در تمامی نمونه‌ها، مثبت تشخیص داده شد. در مرحله دوم، ۹۴٪ نمونه‌های مثبت، لیشمانیاتروپیکا و ۶٪ بقیّه نمونه‌ها، لیشمانیاماژور تشخیص داده شدند.

نتیجه‌گیری: انگل‌های گونه لیشمانیاتروپیکا، در شهرستان مشهد از فراوانی بسیاربالایی برخوردار است.

واژه‌های کلیدی: لیشمانیاتروپیکا؛ لیشمانیاماژور؛ لیشمانیازیس جلدی؛ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز؛ مشهد

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۳۹۳؛ ۲۱ (۲): ۲۴۴-۲۵۲.

دریافت: ۱۳۹۲/۰۵/۲۳ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۷/۲۹

[1] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد انگل‌شناسی، بخش انگل‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

[2] نویسنده مسؤول، استاد، گروه انگل‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

آدرس: مشهد- دانشگاه فردوسی- دانشکده دامپزشکی- بخش انگل‌شناسی

تلفن: ۰۵۱۳۸۷۶۳۸۵۱ نمابر: ۰۵۱۳۸۷۶۳۸۵۲ پست الکترونیکی: razmi@um.ac.ir

[3] دانشیار، گروه انگل‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

بیماری لیشمانیوز، یکی از بیماری‌های مهم مناطق گرمسیر، نیمه‌گرمسیر و گرم و مرطوب است (۱). عامل بیماری، تک‌یاخته داخل‌سلولی از خانواده تریپانوزوماتیده و جنس لیشمانیا می‌باشد. این بیماری، هم‌اکنون در ۸۸ کشور به‌صورت آندمیک وجود دارد (۲). در ایران، لیشمانیوز جلدی و احشایی، از بیماری‌های مهم انگلی بوده و نوع جلدی آن به دو نوع شهری (خشک) و روستایی (مرطوب) دیده می‌شود که عامل لیشمانیوز جلدی روستایی در ایران، لیشمانیاماژور و عامل شهری لیشمانیاتروپیکا می‌باشد که هرکدام از آنها دارای کانون‌های متعدّدی هستند (۳، ۴). لیشمانیوز جلدی، توسط گونه‌های خاصّی از پشه‌خاکی‌های فلبوتومینه منتقل می‌گردد. سگ و جوندگان، از مخازن این بیماری می‌باشند (۵). بررسی اپیدمیولوژیک ۵ ساله (۱۳۸۰-۱۳۸۴) لیشمانیازیس جلدی در ایران، بیانگر آن است که تعداد موارد بیماری در سال ۱۳۸۱ نسبت به سال ۱۳۸۰، حدود ۵٪ کاهش داشته و پس از آن از سال ۱۳۸۱ تا سال ۱۳۸۴، تعداد موارد مثبت رو به افزایش بوده است (۶). شهر مشهد، از کانون‌های مهم لیشمانیوز جلدی در ایران می‌باشد و همه‌ساله، این بیماری باعث ایجاد ضایعات پوستی در بیماران این شهر می‌شود (۷). از سال ۱۳۷۷ تا ۱۳۸۸، در مجموع ۳۴۹۵۸ نفر بیمار، از ۴ مرکز بهداشت مشهد گزارش شده‌اند که بالاترین و پایین‌ترین میزان آلودگی به‌ترتیب: ۱۵/۹٪ در سال ۱۳۸۱ و ۲/۳٪ در سال ۱۳۷۹ بوده است (۸). برای تشخیص بیماری، روش‌های مختلفی مورد استفاده قرار می‌گیرد که در این میان، گسترش مستقیم، کشت تک‌یاخته و روش‌های مولکولی، از مهمترین روش‌های تشخیصی هستند (۹). تشخیص گونه‌های عامل بیماری بر اساس تشخیص میکروسکوپی و نیز مشخصات مورفولوژیک و شواهد اپیدمیولوژیکی و بالینی، بسیار مشکل می‌باشد (۱۰- ۱۱؛ به‌همین دلیل، استفاده از روش‌های مولکولی و ایزوآنزیمی برای تشخیص گونه‌های لیشمانیا ضروری بوده و نیز کاربرد روش‌های مولکولی از جمله PCR، تحوّل عظیمی در تعیین گونه انگل ایجاد نموده است (۱۱). در دو دهه اخیر، سیمای اپیدمیولوژیک لیشمانیوز پوستی در ایران ناشی از جابه‌جایی جمعیت بین مناطق شهری و روستایی و نیز هجوم پناهندگان کشورهای همسایه نظیر: افغانستان و عراق به ایران، دچار تغییر و تحوّل شده است (۱۱)؛ بنابراین برای کنترل و پیشگیری از آن، داشتن اطلاعات کافی از وضعیت اخیر بیماری، به‌خصوص تعیین گونه‌های عامل در هر یک از مناطق کشور ضروری می‌باشد. با توجه به مطالعات اندک شناسایی ملکولی گونه‌های لیشمانیا در شهرستان مشهد در سال‌های اخیر، در این مطالعه تلاش گردید که گونه‌های عامل لیشمانیوز جلدی انسانی در مشهد، با روش مولکولی Semi-nested PCR مورد بررسی قرار گیرد.

روش تحقیق

این مطالعه توصیفی- مقطعی، طی پاییز ۱۳۹۰ تا تابستان ۱۳۹۲ در شهرستان مشهد انجام گرفت. ابتدا ۱۰۰ بیمار از بین بیمارانی که لیشمانیوز جلدی آنها با روش مشاهده مستقیم انگل در گسترش رنگ‌آمیزی‌شده در سه آزمایشگاه تشخیص طبی در مشهد (بیمارستان فارابی، دکتر علمداری و کلینیک سرور) تأیید شده‌بود، به روش تصادفی ساده انتخاب گردیدند. از ترشحات زخم ۲۵ بیمار از ۱۰۰ بیمار انتخاب‌شده، به روش تصادفی ساده، کشت تک‌یاخته در محیط NNN غنی‌شده با RPMI انجام شد. با استفاده از کیت تجاری، نمونه‌های گسترش مستقیم تهیه‌شده به‌همراه محیط کشت‌های مثبت‌شده در کل به تعداد ۱۰۰ نمونه، مورد استخراج DNA قرار گرفتند (DNAExtraction Kit، مرکز رشد زیست‌فناوری پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک- تهران).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- توالی پرایمرهای به‌کاررفته در PCR اختصاصی جنس لیشمانیا (RV2-RV1)

Primer	Nucleotide sequences	PCR-product
RV1	5'-CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG-3'	145bp (Leishmani)
RV2	5'-CCACCTGGCCTATTTTACACCA-3'	

جدول۲-توالی پرایمرهای به‌کاررفته در Semi –nested PCR اختصاصی گونه‌های لیشمانیا (LIN19، LIN17، LINR4)

Primer	Nucleotide sequences	PCR-product
LINR4	5'- GGGGTTGGTGTAAAATAGGG-3'	720,760 and 650bp L infantum,L tropica.L major
LIN17	5'- TTTGAACGGGATTTCTG- 3'	
LIN19	5'- CAGAACGCCCCTACCCG -3'	

DNA استخراج‌شده نمونه‌ها، به درون میکروتیوب انتقال داده شدند و در دمای ۲۰- سانتی‌گراد در فریزر تا زمان انجام آزمایش PCR، نگهداری گردیدند. برای تأیید تشخیص جنس تک‌یاخته لیشمانیا، نمونه‌های DNA استخراج‌شده، ابتدا بر اساس روش کار Lachaud[1] و همکاران (۱۲)، با استفاده از پرایمرهای یونیورسال، مورد آزمایش PCR قرار گرفتند (جدول ۱). نمونه‌های مثبت، واجد باند قابل رؤیت ۱۴۵bp می‌باشند.

برای تشخیص ملکولی گونه‌های مختلف لیشمانیا، از تکنیک Aransay[2] و همکاران با روش Semi-nested PCR استفاده شد (۱۳). در این آزمایش، از سه پرایمر LINR4 (Forward)، LIN17 (first-step Reverse) و LIN19 (second-step Reverse) استفاده شد (جدول ۲) که برای تعیین گونه انگل در این روش، باند حاصل، برای لیشمانیااینفانتوم ۷۲۰ جفت باز، برای لیشمانیاتروپیکا ۷۶۰ جفت باز و برای لیشمانیاماژور ۶۵۰ جفت باز می‌باشد.

اطلاعات به‌دست‌آمده مربوط به سن، جنس و مشخصات زخم‌ها، جمع‌بندی و نتایج آنها با آزمون کای‌اسکوئر با استفاده از نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۱۳) در سطح آلفای مساوی ۰/۰۵ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

یافته‌ها

۵۸ نفر از ۱۰۰ بیمار مورد مطالعه (۵۸٪)، زن و ۴۲ نفر (۴۲٪) مرد بودند.

بیشترین فراوانی بیماری در گروه سنی ۲۰-۲۹ سال (۳۴٪) و ۰-۹ سال (۲۴٪) و کمترین میزان در گروه سنی بیشتر از ۵۰ سال (۶٪) مشاهده شد (P<۰/۰۵)؛ در گروه سنی ۱۰-۱۹ سال (۴٪)، ۳۰-۳۹ سال (۱۸٪) و ۴۰-۴۹ سال (۱۴٪) نیز بیماری دیده شد. ۶ بیمار، آلوده به لیشمانیاماژور و ۹۴ نفر آلوده به لیشمانیاتروپیکا بودند. از ۶ بیمار آلوده به لیشمانیاماژور، ۵ بیمار دارای زخم مرطوب بودند و زخم در بیمار دیگر که حدود ۳ هفته از بروز آن می‌گذشت، به مرحله ترشح نرسیده بود و نیز از ۹۴ بیمار آلوده به لیشمانیاتروپیکا، ۸۲ بیمار (۸۷/۲٪) دارای زخم خشک بودند و ۱۲ بیمار (۱۲/۸٪)، زخم آنها دارای ترشحات چرکی بود. در مجموع، ۲۱۷ زخم در ۱۰۰ بیمار شمارش گردید که بیماران، بیشترین زخم‌ها را به‌ترتیب: در دست و صورت و کمترین زخم‌ها را در ساق پای خود داشتند. بیشتر بیماران، واجد ۱ الی ۲ زخم (۵۱/۶٪ زخم‌ها) در بدن و تعداد کمی از آنها، بیشتر از ۶ زخم (۶/۵٪ زخم ها) در بدن داشتند. اندازه زخم‌ها در ۴۸/۹٪ موارد، بین ۱-۵ میلی‌متر بود و در ۹۲/۶٪ زخم‌های مشاهده‌شده، از زمان بروز تا زمان مراجعه به آزمایشگاه، ۶ ماه گذشته بود (جدول ۳).

[1] *Laurence Lachaude*
[2] *Aransay*

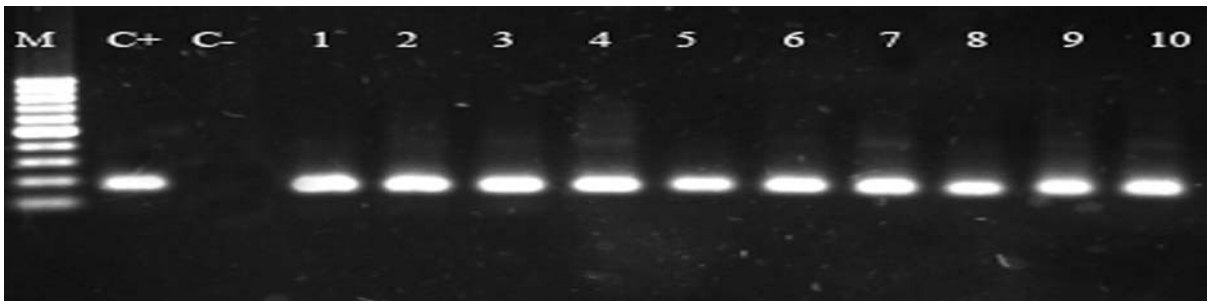
www.SID.ir

Archive of SID

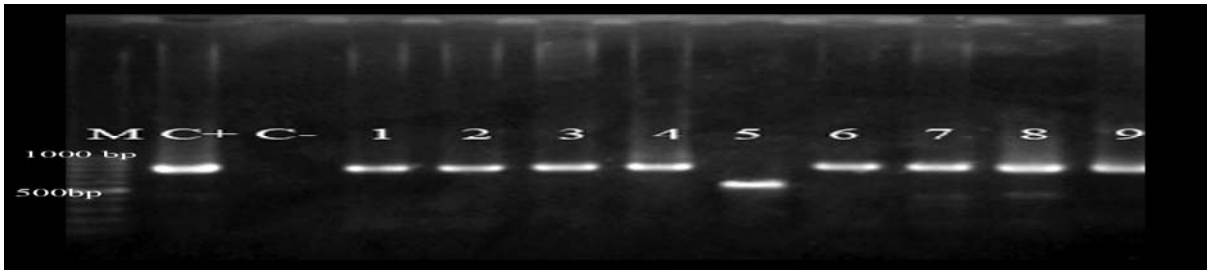
جدول ۳- توزیع فراوانی محل زخم‌های سالک در بدن بیماران برحسب تعداد زخم، اندازه زخم، مدت زمان بروز زخم

محل	محل زخم‌ها			فراوانی زخم ها بر اساس تعداد زخم در هر بیمار			فراوانی زخم‌ها بر اساس اندازه (mm)			فراوانی زخم‌ها بر اساس مدت زمان گذشته از زخم (ماه)		
	تعداد بیماران	تعداد زخم‌ها	درصد زخم‌ها	۱-۲	۳-۶	۶+	۱-۵	۶-۱۰	۱۰+	۰-۲	۲-۶	۶+
صورت	۳۰*	۵۰*	٪۲۳	۴۰	۱۰	–	۳۲	۱۰	۸	۲۴	۲۰	۶
دست	۳۶*	۱۰۴*	٪۴۸	۲۸	۶۲	۱۴	۴۰	۲۶	۳۸	۳۸	۵۸	۸
ساعد	۱۶	۲۸	٪۱۲/۹	۲۲	۶	–	۱۶	۸	۴	۲۴	۴	–
پا	۸	۱۲	٪۵/۵	۱۲	–	–	۲	۱۰	–	–	۱۲	–
ساق پا	۳*	۸*	٪۳/۷	۲	۶	–	۶	–	۲	۶	۲	–
سایر	۷	۱۵	٪۶/۹	۸	۷	–	۱۰	۱	۴	۸	۵	۲
تعداد کل	۱۰۰	۲۱۷	٪۱۰۰	۱۱۲	۹۱	۱۴	۱۰۶	۵۵	۵۶	۱۰۰	۱۰۱	۱۶
	درصد زخم‌ها			٪۵۱/۶	٪۴۱/۹	٪۶/۵	٪۴۸/۹	٪۲۵/۳	٪۲۵/۸	٪۴۶/۱	٪۴۶/۵	٪۷/۴

از ۲۵ کشت انجام‌شده، در ۹ کشت، تکثیر پروماستیگوت مشاهده شد. در آزمایش PCR، برای تشخیص جنس لیشمانیا، تمام ۱۰۰ نمونه انتخاب‌شده (۹ کشت مثبت‌شده بیماران و ۹۱ گسترش مستقیم از سایر بیماران)، از نظر آلودگی به جنس تک‌یاخته لیشمانیا، واکنش مثبت نشان دادند (شکل ۱). روی ۱۰۰ نمونه مثبت در مرحله اول، آزمایش Semi–nested PCR برای تعیین گونه‌های لیشمانیا انجام گرفت. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که ۹۴٪ نمونه‌ها لیشمانیاتروپیکا و ۶٪ نمونه‌ها لیشمانیا ماژور بودند. (شکل ۲)



شکل ۱- نتایج PCR برای شناسایی جنس لیشمانیا. M: مارکر، +C: کنترل مثبت، -C: کنترل منفی و شماره‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰ نمونه‌های مثبت (باند bp ۱۴۵ نشان‌دهنده وجود جنس لیشمانیا می‌باشد).



شکل ۲- نتایج seminested-PCR برای شناسایی گونه‌های لیشمانیا. M: مارکر، C+: کنترل مثبت، C-: کنترل منفی، شماره ۵ لیشمانیاماژور و بقیه شماره‌ها لیشمانیاتروپیکا هستند (باندهای bp760 نشان‌دهنده وجود لیشمانیاتروپیکا و bp650 لیشمانیاماژور می‌باشد).

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

با توجه به شیوع بالای لیشمانیوز جلدی در مشهد و اهمیّت زئونوتیک‌بودن آن و از آنجایی‌که بسته به نوع گونه عامل سالک، مبارزه بر ضدّ بیماری تا حدودی متفاوت می‌باشد، مطالعه حاضر به‌منظور تعیین گونه انگل‌های عامل لیشمانیازیس جلدی با روش مولکولی در شهرستان مشهد، در بخش انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد صورت گرفت. در مطالعه حاضر، برای استخراج DNA، از گسترش‌های تهیه‌شده از همه بیماران استفاده شد. تمام نمونه‌های استخراج‌شده در مرحله اول PCR، از نظر وجود جنس لیشمانیا، مثبت تشخیص داده شدند. در این مطالعه، از گسترش نسجی برای صرفه‌جویی در وقت و هزینه در استخراج DNA استفاده شد. در مطالعه مشابهی، معتضدیان و همکاران در سال ۲۰۰۲، با استخراج DNA از ۹۲ گسترش رنگ‌آمیزی‌شده با گیمسا از افراد مشکوک به لیشمانیازیس پوستی و انجام PCR، نشان دادند که کلّیه نمونه‌های تهیه‌شده از اسلایدهای دارای انگل، نتیجه مثبت نشان دادند و حتی در ۴ نمونه فاقد انگل نیز آزمایش PCR مثبت گردید. این نتایج نشان داد که گسترش‌های نسجی، منبع بسیارعالی برای استخراج DNA و انجام روش PCR می‌باشند (۱۴). در مطالعه حاضر، به‌منظور تشخیص گونه لیشمانیا، از تکنیک مولکولی Aransay و همکاران استفاده شد(۱۳). در ایران برای تشخیص گونه استفاده گردیده است که نتایج آن، نشان‌دهنده حساسیّت و ویژگی بالای این روش در تشخیص گونه‌های لیشمانیا در بیماران، مخازن و نیز ناقلین بیماری بوده است. از مجموع ۱۰۰ نمونه مثبت در مرحله اول، در ۹۴٪ آنها لیشمانیاتروپیکا و در ۶٪ بقیّه لیشمانیاماژور با روش Semi–nested PCR تشخیص داده شد. در مطالعات دیگر صورت‌گرفته در شهر مشهد، فتی و همکاران در سال ۱۳۸۲، با روش منوکلونال آنتی‌بادی، میزان آلودگی لیشمانیاتروپیکا، لیشمانیاماژور و گونه‌های ناشناخته را به‌ترتیب: ۶۶/۶٪، ۲۸/۸٪، ۴/۲٪ به‌دست آوردند (۱۰)، حجّاران و همکاران در سال ۱۳۸۳، با روش RAPD-PCR، در ۹۴/۲٪ موارد لیشمانیاتروپیکا و در ۵/۸٪ موارد لیشمانیاماژور را در افراد بیمار در شهرستان مشهد تشخیص دادند (۱۵). محمودی و همکاران نیز در سال ۱۳۸۸ در مطالعه خود در مشهد، با روش PCR، فراوانی آلودگی به لیشمانیاتروپیکا را در ۹۰/۵٪ نمونه‌ها و لیشمانیاماژور را در ۹/۵٪ نمونه‌ها تعیین نمودند (۱۶). تمام نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعات، با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد و اهمیّت گونه لیشمانیاتروپیکا در مقایسه با لیشمانیاماژور در ایجاد لیشمانیوز جلدی در انسان را در شهر مشهد نشان می‌دهد. در سایر شهرهای استان خراسان رضوی نیز تاکنون مطالعاتی برای شناسایی گونه‌های لیشمانیا انجام گرفته است. مهاجری و همکاران در سال ۱۳۸۷، ۵۷ نمونه انگلی جداشده از افراد مبتلا به لیشمانیوز جلدی در شهرستان نیشابور را به روش RAPD-PCR مورد آزمایش قرار دادند و گونه عامل لیشمانیوز در تمامی نمونه‌ها را لیشمانیاتروپیکا تشخیص دادند (۱۷). مهاجری و همکاران در مطالعه دیگری در سال ۱۳۸۹، نمونه‌های تهیه‌شده از زخم ۸۶ بیمار در شهرستان سبزوار را با روش PCR مورد آزمایش قرار دادند که از مجموع ۸۶ نمونه، ۳۲ نمونه لیشمانیاتروپیکا و ۵۴ نمونه لیشمانیاماژور بودند (۱۸). در سایر شهرهای کشور نیز مطالعات زیادی برای شناسایی گونه‌های لیشمانیا انجام گرفته و نیز وجود این دو گونه در بروز لیشمانیوز جلدی تأیید گردیده است. در مطالعه‌ای که حجازی و همکاران در سال ۱۳۷۹ در شهر اصفهان انجام دادند، ۱۲۰ ایزوله انگل به روش پادتن‌های تک‌دودمانی اختصاصی مورد بررسی قرار گرفتند که تعدادی از نمونه‌ها به‌منظور تأیید داده‌های حاصل از روش فوق، با روش PCR و الکتروفورز ایزوآنزیم‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. از مجموع ۱۲۰ نمونه، ۱۰۰ مورد، عامل بیماری لیشمانیاماژور و ۸ مورد لیشمانیاتروپیکا بوده است و در ۱۲ مورد، نتایج مشکوک حاصل شد (۱۹). در مطالعه ثقفی‌پور و همکاران در سال ۱۳۹۱ که در بخش مرکزی استان قم با استفاده از

www.SID.ir

Archive of SID

تکنیک PCR-RFLP برای تعیین هویّت انگل لیشمانیا، ۱۵ نمونه انسانی و یک نمونه از جونده گونه مریونس‌لیبیکوس، مورد آزمایش قرار گرفتند، مشخص شد که انگل موجود در لام‌های انسانی و جونده، لیشمانیاماژور بوده است (۲۰). تنوّع در نحوه پراکندگی گونه‌های عامل لیشمانیازیس جلدی در ایران، ارتباط مستقیمی با وجود مخازن و ناقلین بیماری در هر منطقه دارد. مطالعات ندیم و همکاران نشان می‌دهد که وجود گونه‌های پشه فلبتوموس به‌عنوان ناقلین لیشمانیوز روستایی و شهری و تکثیر موش‌های ژربیل به‌عنوان مخازن لیشمانیوز روستایی، ارتباط مستقیمی با نوع خاک، آب و هوا در هر منطقه ایران دارد (۱). در این مطالعه، میزان لیشمانیوز جلدی در دو جنس مرد و زن، واجد اختلاف معنی‌داری نبود. در مطالعه‌های مشابه انجام‌یافته توسط رفعتی و همکاران در شهرستان دامغان و همچنین دهقان و همکاران در شهرستان لارستان نیز تفاوت معنی‌داری بین میزان شیوع آلودگی لیشمانیوز جلدی در زن و مرد به‌دست نیامد (۲۱، ۲۲)؛ درحالی‌که مطالعه انجام‌یافته توسط عباسی و همکاران در شهر گرگان، نشان‌دهنده شیوع بالاتر بیماری در مردان نسبت به زنان می‌باشد (۲۳). در این مطالعه، بیشترین میزان بیماری در دو گروه سنی ۰–۹ سال و ۲۰–۲۹ به‌ترتیب: ۲۴٪ و ۳۴٪ دیده شد. نتایج این مطالعه با سایر مطالعات انجام‌شده در ایران همخوانی دارد. در مطالعه رفعتی و همکاران، بیشترین میزان بیماری در گروه سنی ۱۰–۱۹ و ۲۰–۲۹ سال به‌ترتیب: ۲۲/۹٪ و ۳۹/۴٪ دیده شد (۲۱) و در مطالعه عباسی و همکاران، بیشترین میزان بیماران در گروه‌های سنی ۱۰–۱۴، ۱۵–۱۹ و ۲۰–۲۴ سال مشاهده گردید (۲۳)؛ همچنین در مطالعه دهقان و همکاران، بیشترین میزان بیماری در گروه سنی ۰–۹ سال به‌میزان ۴۳/۹۴٪ گزارش شد (۲۲). در این مطالعه، فراوانی بیشترین زخم‌ها در دست و سپس در صورت بود و کمترین درصد زخم‌ها در پا، تنه و سایر اندام‌ها که معمولاً پوشیده‌اند، دیده شد. در مطالعه دهقان و همکاران، بیشترین زخم‌ها در ناحیه دست و صورت و سپس در ناحیه پا گزارش گردید (۲۲). ثقفی‌پور و همکاران در قم، فراوانی زخم لیشمانیا را به‌ترتیب: در دست، پا و صورت گزارش نمودند (۲۴). در مطالعه خارفی و همکاران در تونس، ۶۰٪ ضایعات در صورت، ۱۴٪ در دست و ۷٪ در پا گزارش شد (۲۵). با توجه به پوشیده‌بودن سایر نقاط بدن و عدم پوشش دست، پا و صورت، احتمال گزش و ایجاد ضایعه در این نواحی بیشتر بوده و توصیه می‌شود تا حدّ امکان از پوشش کامل‌تری به‌خصوص در مناطقی که بیماری شایع است، استفاده شود. در مطالعه حاضر، ۵۱/۶٪ بیماران، واجد ۱ تا ۲ زخم، ۴۱/۹ بیماران واجد بین ۳ تا ۶ زخم و تنها ۶/۵٪ بیماران بیشتر از ۶ عدد زخم داشتند. این نتایج با نتایج به‌دست‌آمده توسط یعقوبی و همکاران (۴)، دهقان و همکاران (۲۲) و رفعتی و همکاران همخوانی دارد (۲۱). این موضوع احتمالاً می‌تواند با تعداد گزش و شیوه خون‌خواری پشه‌ها ارتباط داشته باشد. در مطالعه حاضر، اندازه بیشتر زخم‌ها کمتر از ۵ میلی‌متر بوده است؛ از طرف دیگر از زمان بروز زخم‌ها تا هنگام مراجعه، در ۹۲/۶٪ افراد، کمتر از ۶ ماه گذشته بوده است که می‌تواند دلیلی بر رابطه اندازه زخم و مدت بروز زخم باشد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، DNA استخراج‌شده از گسترش‌های نسجی تحت آزمایش PCR نشان داد که گونه غالب لیشمانیوز جلدی در شهر مشهد، لیشمانیاتروپیکا می‌باشد. از آنجایی‌که که لیشمانیاتروپیکا، می‌تواند سگ را به‌طور تصادفی آلوده نماید، بنابراین همکاری اداره بهداشت و دامپزشکی برای کنترل بیماری از اهمیت زیادی برخوردار است.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله نویسندگان، از همکاری صمیمانه خانم علمداری و پرسنل آزمایشگاه خصوصی، خانم کوشش‌گران و پرسنل آزمایشگاه بیمارستان فارابی و آقای شاهرودیان و پرسنل آزمایشگاه کلینیک سرور در مشهد و نیز از کارشناسان

www.SID.ir

Archive of SID

بخش انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی می‌نمایند.
مشهد- آقایان عشرتی، آذری و محمدنژاد- تشکر و قدردانی

منابع:

1- Nadim A, Javadian E, Sedirashti, Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Iran. In: Ardahli Rezai Nadim (Eds.). Leishmania and leishmaniosis. 2nd ed. Iran: University press center, 1985. pp: 149-75. [Persian]

2- Davies CR, Reithinger R, Campbell-Lendrum D, Feliciangeli D, Borges R, Rodriguez N. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. Cad Saude Publica. 2000; 16(4): 925-50.

3- Rassi Y, Javadian E, Jalali M, Motazedian MH, Vatndoost H. Investigation on Zoonotic Cutaneous Leishm- aniasis, Southern Iran. Iranian Journal of Public Health. 2004; 33(1): 31-5.

4- Yaghoobi-Ershadi MR, Akhavan AA, Zahraei-Ramazani AV, Abai MR, Ebrahimi B, Vafaei-Nezhad R, et al. Epidemiological study in a new focus of cutaneous leishmaniasis in the Islamic republic of Iran. East Mediterr Health J. 2003; 9(4): 816-26.

5- Yaghoobi-Ershadi MR, Hanafi-Bojd AA, Javadian E, Jafari R, Zahraei-Ramazani AR, Mohebali M. A new focus of cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania tropica. Saudi Med J. 2002; 23(3): 291-4.

6- Athari A, Jalal lu N. A five -year survey of cutaneous leishmaniasis in iran (2001-2006). Journal of Isfahan Medicine School. 2006; 24(82): 8-13. [Persian]

7- Nadim A. Leishmanioses. In: Azizi F (eds.) Epidemiology and control of prevalent diseases in Iran. 2nd ed. Iran: Publications of Payam Noor University; 2000. pp: 524-32. [Persian]

8- Karimian Shirazi M, Razmi GR, Naghibi A (eds.) The retrospective study of the prevelance of cutaneous leishmaniosis in Mashhad area. 8th NICOPA; 2012; OCT 16-18, Kerman, IRAN. [Persian]

9- Karimian Shirazi M, Razmi GR, Naghibi A(eds.) Isolation *leishmania* by culturing with NNN media enriched by RPMI. 8th Iranian veterinary student congress; 2012; 4-6 Sep, Tabriz, Iran. [Persian]

10- Fata AAM, Dalimi Asl H, Jaefari MR, Mohajeri M, Khamesipour A,Valizadeh M. Clinical appearance, leishmanin test & elisa using monoclonal antibody in diagnosis of different forms of cutaneous leishmaniasis. Medical Journal of Mashhad University of Medical Sciences. 2004; 47(83): 19-27. [Persian]

11- Mohajeri M, Hatam Gh.R, Shamsian SAA, Javaheri A. Isolation of Leishmania majorby isoenzyme electrophoresis method in Mashhad. Medical Journal Mashhad University of Medical Sciences. 2005; 48(88): 177-84. [Persian]

12- Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. J Clin Microbiol. 2002; 40(1): 210-15.

13- Aransay AM, Scoulica E, Tselentis Y. Detection and Identification of *Leishmania* DNA within Naturally Infected Sand Flies by Seminested PCR on Minicircle Kinetoplastic DNA. Appl Environ Microbiol. 2000; 66(5): 1933-8.

14- 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 Parasit. 2002; 96(1): 31-4.

15- Hajjaran H, Mohebali M, Razavi MR, Rezaei S, Kazemi B, Edrissian GhH, et al. Identification of *leishmania* species isolated from human cutaneous leishmaniasis, using random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR). Iranian J publ Health. 2004; 33(4): 8-15.

16- Mahmoodi MR, Mohajeri M, Tavakkoli Afshar J, Shakeri MT, Yazdan Panah MJ, Berenji F, et al. Molecular Identification of Leishmania Species Causing Cutaneous Leishmaniasis in Mashhad, Iran. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2010; 3(4): 195-200.

17- Mohajery M, Hajjaran H, Shamsiyan AA, Tavakkol Afshari J, Saadabadi F. Identification of Leishmania Species Causing Cutaneous Leishmaniasis by RAPD-PCR. Medical Journal of Mashhad University of Medical Sciences. 2008; 51(2): 79-86. [Persian]

www.SID.ir

Archive of SID

18- Mohajery M, Shamsian M, Rezaei A, Hasan poor K, Shakeri MT, Farnoosh GR. Evaluation of mulecular epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Sabzevar. Medical Journal of Mashhad University of Medical Sciences. 2010; 53(3): 138-44. [Persian]

19- Hejazi SH, Nasrifar P, Jamali S, Jahangir Nezhad AA, Khamesipour A. Identification of leishmaniasis species using monoclonal antibodies in Isfahan. Iran J Dermatol. 2000; 4(1): 7-11. [Persian]

20- Saghafipour A, Rassi Y, Abai MR, Oshaghi MA, Yaghoobi Arshadi MR, Mohebali M, et al . Identification of Leishmania species in patients and reservoir rodents using PCR–RFLP in the central county of Qom province in 2010. Arak University of Medical Sciences Journal. 2012; 15(6): 1-10. [Persian]

21- Rafati N, Shaporimoghadem A, Ghorbani R. Epidemiological study of cutaneous leishmaniasis in Damghan (2000-2006). Koomesh, Journal of Semnan Univercity of Medical Science. 2007; 8(4): 247-54. [Persian]

22- Dehghan A, Ghahramani F, Hashemi B. Study on cutaneous leishmaniasis in Lorestan From 2005-2008. Journal of Jahrom Uiversity of Medical Sciences. 2009; 8(12): 7-11. [Persian]

23- Abbasi A, Ghanbary MR, Kazem Nezhad K. The epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Gorgan(1998-2001). Journal of Army University of Medical Sciences of The I.R. Iran (Jaums). 2004; 2(1): 275-8. [Persian]

24-Saghafipour A, Akbari A, Rasi Y, Mostafavi R . Epidemiological study of leishmaniasis in Qom. Qom University of Medical Science Journal 2012 ;1(6):27-31 [persian]

25- Kharfi M, Benmously R, El Fekih N, Daoud M, Fitouri Z, Mokhtar I, et al. Childhood leishmaniasis: Report of 106 cases. Dermatology Online Journal.2004; 10(2): 6

www.SID.ir

Archive of SID

Abstract *Original Article*

Molecular identification of *Leishmania* species causing cutaneous leishmaniasis in Mashhad, Iran

Mohhammed Karimian Shirazi[1], Gholamreza Razmi[2], Abolghasem Naghibi[3]

Background and Aim: Cutaneous leishmaniasis is an endemic disease with notorious public health effects in Iran. The clinical symptoms of the disease were identified as dry and wet forms. It is essential to distinguish leishmania species in every area in order to design a control plan of the diseases. Regarding the morphological similarity of leishmania parasites in different species, it is necessary to employ sensitive diagnostic methods including PCR to differentiate of them. In the present study, a molecular assessment was done to identify leishmania species in Mashhad between autumn 2011 and summer 2013.

Materials and Methods: Firstly, tissue smears were collected from the lesions of 100 and from the ulcers of 25 patients; and were cultured in NNN nutrified with RPMI. The positive samples (tissue smears and culture) were used for DNA extraction and PCR. PCR methods were used in two steps. First, a sensitive PCR was used to detect leishmania genus and, secondly, positive samples were examined with species specific semi-nested– PCR.

Results: In the first step of PCR, all of the samples were proved to be positive for Leishmania spp and in second step Leishmania tropica and L.major were detected in 94% and 6% in positive –PCR amplicon, respectively.

Conclusion: Based on the results, Leishmania tropica is more prevalent than L.major in Mashhad.

Key Words: Leishmania tropica; Leishmania major; Cutaneous Leishmaniasis; PCR; Mashhad

Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2014; 21 (2): 244-252.

Received: August 14, 2013 ***Accepted: October 21, 2013***

[1] *Student of M.Sc of Parasitology, Department of Pathobiology, Faculty of Vet. Med, Ferdowsi University of Mashhad, mashhad, Iran;*

[2] *Corresponding Author; Ph.D of Parasitology, Department of Pathobiology, Faculty of Vet. Med, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran razmi@um.ac.ir*

[3] *Ph.D of Parasitology, Department of Pathobiology, Faculty of Vet. Med, Ferdowsi University of Mashhad, mashhad, Iran.*

www.SID.ir