مقایسه روش PCR مستقیم با روشهای میکروسکوپی و کشت in vitro برای تشخیص لیشمانیوز جلدی

بهمن فولادی*، دکتر ایرج شریفی**، دکتر عادل ابراهیم زاده***، دکتر محمد هاشمی شهری***
حمیدرضا مرادقلی****، افسانه سرابندی نو*****، دکتر اصغر فضائلی***

*دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی زابل، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی
**مرکز تحقیقات لیشمانیا، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمان، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی
***مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی زاهدان
****مرکز بهداشت شهرستان زاهدان
*****دانشگاه آزاد اسلامی واحد زاهدان.

تاریخ دریافت مقاله : ۸۶/۴/۱۷
تاریخ پذیرش مقاله :۸۶/۱۰/۲۶

چکیده

زمینه و هدف: لیشمانیوز جلدی در ایران دارای کانون های متعددی است و طی دو دهه اخیر رو به فزونی بوده و کانونهای جدیدی را به وجود آورده است. تشخیص این بیماری معمولا به روش میکروسکوپی صورت می گیرد اما این روش از حساسیت لازم برخوردار نیست و استفاده از روش های دیگری مانند PCR مورد توجه قرار گرفته است. در مطالعه حاضر، کارآیی روش PCR در مقایسه با روش میکروسکوپی و کشت *in vitro* برای تشخیص مستقیم لیشمانیوز جلدی و شناسایی گونه انگل مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش کار: در این مطالعه از تعداد ۷۳ بیمار مشکوک به لیشمانیوز جلدی از روستاهای میرجاوه در فاصله زمانی زمستان ۱۳۸۴ تا بهار ۱۳۸۵ نمونه برداری از زخم انجام شد و نمونه ها با سه روش میکروسکوپی، PCR و کشت در محیط NNN مورد آزمایش تشخیصی قرار گرفتند. حساسیت و ویژگی روش ها بر اساس ماخذ Wassertheil-Smolle محاسبه گردید.

یافته ها: ۳۸/۴درصد از نمونه ها با روش میکروسکوپی، ۵۵/۵ درصد با روش PCR و ۶۳/۱۵ درصد با روش کشت NNN مثبت تشخیص داده شدند. با روش PCR مستقیم گونه انگل در همه نمونه ها لیشمانیا ماژور (Leishmania major) تعیین شد. حساسیت و ویژگی محاسبه شده در مقایسه با روش کشت، برای روش میکروسکوپی بترتیب ۶۱٪ و ۱۰۰٪ و برای روش PCR ۷۶٪ و ۷۳٪ بدست آمد. حساسیت هر دو روش میکروسکوپی و PCR از روش کشت پائین تر بود اما حساسیت PCR در مقایسه با روش میکروسکوپی بالاتر بود.

نتیجه گیری: با توجه به حساسیت بالاتر روش PCR نسبت به روش میکروسکوپی و قابلیت آن در شناسایی گونه انگل لیشمانیا (همزمان با تشخیص) و همچنین حساسیت چشمگیر روش کشت، پیشنهاد می گردد امکان انجام این دو روش (PCR و کشت) در کنار آزمایش میکروسکوپی حداقل در برخی مراکز تشخیصی فراهم گردد تا در مواردی که نیاز به تشخیص گونه لیشمانیا می باشد و هم در موارد مشکوکی که لام میکروسکوپی منفی می شود مورد استفاده قرار گیرند. **(مجله طبیب شرق، دوره نهم، شماره ۳، پائیز ۸۶، ص ۱۸۱ تا ۱۸۹)**

کلیدواژه ها: لیشمانیوز جلدی، تشخیص، PCR، In vitro

مقدمه

لیشمانیوز جلدی (سالک) یکی از بیماری های شایع پوستی است که در ۸۸ کشور جهان از جمله ایران آندمیک است و حدود ۳۵۰ میلیون نفر در معرض ابتلا به بیماری هستند.[۱]

برای تشخیص بیماری در آزمایشگاه های تشخیص طبی و مراکز تشخیصی خصوصی و دولتی معمولاً از روش مستقیم (میکروسکوپی) استفاده می‌گردد. این روش اگر چه ارزان و به راحتی در دسترس می باشد و نیازی به مواد و تجهیزات پیشرفته و حساس ندارد، اما برای تشخیص عامل بیماری در زخمهای جلدی از حساسیت کافی برخوردار نیست. روش کشت in vitro از حساسیت نسبتاً بالا و ویژگی مناسبی برخوردار است

آدرس نویسنده مسئول: زاهدان ، دانشکده پزشکی
Email: afparma1 @yahoo.co.uk

www.SID.ir

اما این روش نیز محدودیتهای خاص خود را دارد از جمله این موارد می توان به عدم امکان دسترسی در همه جا، نیاز به انکوباتور ۲۵ درجه و محیط کشت، احتمال آلودگی های میکروبی و قارچی محیط های کشت و طولانی بودن دوره کشت اشاره کرد. حساسیت روش مستقیم و کشت به گونه انگل و طول دوره زخم سالک بستگی دارد. در بعضی منابع حساسیت ترکیبی این دو روش را بین ۵۰ تا ۷۰ درصد ذکر نموده اند[۲]

تکنیک PCR در سالهای اخیر هم برای تشخیص و هم برای تعیین گونه لیشمانیا استفاده شده است[۳-۶]. اعتقاد بر این است که PCR برای تشخیص بیماری از حساسیت و ویژگی بالاتری نسبت به روشهای میکروسکوپی و بعضی روش های دیگر برخوردار است. یکی دیگر از مزایای روش PCR بالا بودن سرعت انجام آن نسبت به روش کشت است که زودتر به نتیجه می رسد، اگر چه روش میکروسکوپی سریعتر از PCR انجام می شود. Belli و همکاران (۱۹۹۸) حساسیت و ویژگی ۱۰۰ درصد را برای روش PCR نسبت به روش میکروسکوپی گزارش نمودند[۷]. همچنین Aviles و همکاران (۱۹۹۹) به ترتیب حساسیت و ویژگی ۹۲ درصد و ۱۰۰ درصد را برای PCR در مقابل روش میکروسکوپی با حساسیت ۴۲ درصد، روش هیستولوژی با حساسیت ۳۳ درصد و تشخیص سرولوژیک (IgG) با حساسیت ۲۰ درصد گزارش نمودند[۸]. در بررسی دیگری بر روی تعداد ۱۱۹ نمونه بیوپسی از زخم های پوستی لیشمانیوز آمریکایی توسط Rodrigues و همکاران (۲۰۰۲) نشان داده شد که حساسیت PCR برای تشخیص تحت جنس Viania و تحت جنس Leishmania به ترتیب ۹۵/۴ درصد و ۸۸/۲ درصد و ویژگی آن برای هر دو زیر جنس ۱۰۰ درصد بود[۹]. Gangneux و همکاران (۲۰۰۳) نیز حساسیت و ویژگی بسیار بالایی را با روش PCR نسبت به روش های تشخیص مستقیم و کشت در تشخیص لیشمانیوز گزارش نمودند.[۱۰] نتایج بعضی مطالعات نیز کیفیت بالای روش PCR را با تردید مواجه نموده است. برای مثال در غربالگری سگهای آلوده توسط Reithinger و همکاران (۲۰۰۳)، PCR حساسیت کمتری نسبت به روش الایزا (ELISA) برای تشخیص لیشمانیا دونوانی داشت[۱۱].

بخش هایی از DNA لیشمانیا به عنوان مارکرهای تشخیصی و یا تعیین گونه انگل عامل بیماری تاکنون در کشورهای مختلف از جمله ایران مورد استفاده قرار گرفته است. از جمله: DNA رایبوزومی (SSU rRNA)[۱۲]، توالی های تکراری (repetitive sequences)[۱۲]، DNA کینتوپلاستی (kDNA)[۳-۵و۹و۱۳و۱۴] و ITS-I[۱۵]. تغییرات بازی در مناطقی از سکانس های DNA کینتوپلاستی در بین گونه های مختلف انگل لیشمانیا شناسایی و از این تغییرات برای طراحی پرایمرهای اختصاصی و وابسته به گونه استفاده شده است. این پرایمرها می توانند ضمن تشخیص مستقیم لیشمانیا از نمونه بیمار، گونه انگل لیشمانیا را نیز هم زمان افتراق دهند. هدف از انجام مطالعه حاضر ارزشیابی روش PCR مستقیم با استفاده از پرایمرهای فوق در مقایسه با روش های میکروسکوپی و کشت NNN برای تشخیص زخم های مشکوک به سالک و شناسایی مستقیم گونه انگل عامل بیماری بود تا بر اساس نتایج بدست آمده بتوان در خصوص جایگزینی روش PCR با روشهای دیگر و یا به عنوان روشی مکمل در باره آن قضاوت نمود.

روش کار

این مطالعه مقایسه ای توصیفی در منطقه میل ۷۲ میرجاوه در فاصله زمانی زمستان ۱۳۸۴ و بهار ۱۳۸۵ انجام شد. حجم نمونه بر اساس اطلاعات موجود برای متغیرهای حساسیت و ویژگی روشهای مستقیم و PCR از ۳۱ نفر تا ۷۸ نفر بدست آمد که بالاترین حجم نمونه در نظر گرفته شد، البته نمونه گیری از تعداد ۵ نفر از بیماران میسر نشد و نهایتا از تعداد ۷۳ نفر از بیماران دارای زخمهای مشکوک به سالک نمونه برداری شد. تمامی ۷۳ نفر بیمار از افراد ساکن در روستاهای منطقه میل ۷۲ میرجاوه بودند که از روستاهای مختلف و یا از عشایر بصورت بیماریابی شناسایی شدند و یا خود به خانه های بهداشتی و درمانگاهها

Archive of SID
www.SID.ir

مراجعه کرده بودند. نمونه ها با خراش دادن کناره های متورم زخم پس از ضد عفونی کردن، تهیه و در سه بخش، کشت NNN، PCR مستقیم و گسترش میکروسکوپی، مورد استفاده قرار گرفتند.

کشت *in vitro NNN* (در محیط): بخشی از نمونه تهیه شده از زخم مستقیماً و در کنار شعله در فاز مایع محیط *NNN* وارد لوله می شد. لوله ها به انکوباتور 25^oC منتقل گردید و پس از آن بررسی میکروسکوپی محیط های کشت هر ۳-۲ روز یکبار با مشاهده یک قطره از محیط مایع کشت با درشتنمایی ۴۰× انجام می گردید و به محض مشاهده اشکال پروماستیگوت لیشمانیا، ۲ تا ۳ قطره از مایع روئی محیط کشت به محیط کشت جدید پاساژ داده می شد. جهت از بین بردن آلودگی میکروبی محیط کشت جنتامایسین به میزان ۱۰۰- ۵۰ *µg /ml* استفاده می شد.

آزمایش میکروسکوپی: از هر نمونه بیمار دو لام مستقیم تهیه و پس از فیکس کردن گسترش ها با متانول، به روش گیمسا رنگ آمیزی گردیده و با عدسی روغنی مورد مشاهده دقیق میکروسکوپی قرار می گرفت. حدا قل ۱۰۰ میدان میکروسکوپی از هر گسترش از قسمت های مختلف مشاهده می گردید.

استخراج *DNA* و انجام *PCR*: بخش دیگری از نمونه ها به لوله های حاوی محلول بافر *PBS* استریل جهت آزمایش *PCR* مستقیم منتقل می گردید و برای آماده سازی نمونه به منظور استخراج *DNA*، نمونه ها پس از سانتریفوژ و شستشو با بافر استریل رسوب گیری می شد و تمامی رسوبها شماره گذاری و تا زمان استفاده در فریزر -20^oC نگهداری می گردید. برای استخراج *DNA*، کیت *DNG-plus* از شرکت سیناژن تهران تهیه و مطابق دستورالعمل مورد استفاده قرار گرفت. *DNA* حاصل برای تشخیص و تعیین گونه انگل لیشمانیا مورد استفاده قرار می گرفت.

برای واکنش *PCR* نیز از کیت شرکت سیناژن تهران استفاده شد. برای آماده سازی مخلوط واکنش، به ازای هر نمونه مقدار ۲۰ µl مخلوط PCR (PCR mix) و ۱ واحد (۰/۵ µl) Taq پلی مراز و ۵ µl DNA نمونه مورد نظر داخل یک میکروتیوب ۰/۲ میلی لیتری ریخته و ۱ قطره روغن معدنی به هر لوله افزوده و در دستگاه PCR (ترموسایکلر از نوع بیومترای فرانسه) قرار داده می شد. برای اطمینان از صحت انجام PCR، در هر نوبت PCR، یک نمونه کنترل مثبت (از DNA لیشمانیا ماژور موجود در کیت) و یک نمونه منفی (استفاده از آب مقطر بجای DNA) نیز همراه با نمونه ها استفاده می گردید. واکنش PCR نیز با شرایط موجود در راهنمای کیت انجام می گردید.

الکتروفوز و تهیه تصویر از محصول *PCR*: مقدار ۱۰ میکرولیتر از محصول هر واکنش *PCR* در ژل آگارز ۲درصد در بافر *TAE* ۰/۵درصد به مدت ۸۰ دقیقه با ولتاژ ۱۰۰ میلی آمپر الکتروفورز گردید. پس از پایان الکتروفورز و رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم برماید (۱ *mg* در ۱۰۰ میلی لیتر بافر *TAE*) نتیجه در دستگاه ژل گرب با اشعه *UV* مشاهده و عکسها در فلاپی ذخیره گردید. برای محاسبه اندازه باندهای مشاهده شده در ژل از مارکر *1kb ladder* شرکت سینا ژن استفاده گردید. مشاهده باندهای ۶۲۰ *bp* نشاندهنده گونه لیشمانیا ماژور، ۸۰۰ *bp* معرف گونه لیشمانیا ترویپکا و عدم مشاهده باند به منزله منفی بودن نمونه تلقی می گردد. حساسیت و ویژگی روشها بر اساس مأخذ *Wassertheil-Smolle* محاسبه گردید.[۱۶]

نمونه برداری از بیماران با کسب رضایت آنان و مطابق روش معمول یک بار انجام گردید. نتایج آزمایش نمونه بیماران جهت پیگیری و درمان به آنها اعلام گردید، ضمنا در تجزیه و تحلیل داده ها و گزارش نتایج نامی از بیماران ثبت نگردید.

یافته ها

از مجموع ۷۳ بیمار ۳۰ نفر مذکر و ۴۳ نفر مونث بین سنین ۲ ماه تا ۵۸ سال بودند و میانگین سنی آنان ۱۴/۶ سال بود. ۵۳ نفر

Archive of SID
www.SID.ir

از این بیماران ایرانی و ۲۰ نفر غیر ایرانی (افغان) بودند. نتایج آزمایش میکروسکوپی در ۲۸ مورد از ۷۳ بیمار (۳۸/۴٪) و نتایج کشت نمونه ها در محیط NNN در ۴۶ مورد (۶۳/۱۵٪) مثبت شد. آزمایش PCR بر روی ۶۳ نمونه از نمونه های فوق انجام گردید که ۳۵ مورد (۵۵/۵٪) مثبت گردید. PCR مستقیم روی ۱۰ نمونه دیگر به دلیل عدم تهیه نمونه آنها برای PCR مستقیم انجام نشد. به منظور مقایسه این ۳ روش در تشخیص بیماری لیشمانیوز، روش کشت NNN بعنوان استاندارد طلایی (Gold standard) در نظر گرفته شد [۱۷] و دو روش دیگر نسبت به این روش مورد سنجش قرار گرفت. حساسیت و ویژگی با حدود اطمینان ۹۵٪، برای روش میکروسکوپی بترتیب(۰/۱۴±۶۱٪) و (۰/۰۶±۱۰۰٪) بدست آمد (جدول ۱)

جدول شماره ۱: مقایسه آزمایش میکروسکوپی با روش کشت برای تشخیص لیشمانیوز جلدی در میرجاوه، ۱۳۸۴

		کشت (NNN)		
		مثبت	منفی	جمع
میکروسکوپی	مثبت	(a) ۲۸	(b) ۰	۲۸
	منفی	(c)۱۸	(d) ۲۷	۴۵
	جمع	۴۶	۲۷	۷۳

Sensitivity (Se) = a ÷ (a+c) = ۲۸ ÷ (۲۸+۱۸) = ٪۶۱ ± ۰/۱۴
Specificity (Sp) = d ÷ (b+d) = ۲۷ ÷ (۰+۲۷) = ٪۱۰۰ ± ۰/۰۶

ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی نیز برای این روش بترتیب ۱ و ۰/۶ حاصل شد. در مورد روش PCR حساسیت و ویژگی بترتیب برابر (۰/۱۶±۷۶٪) و (۰/۱۹±۷۳٪) و ارزش اخباری مثبت و منفی بترتیب ۰/۸۰ و ۰/۶۸ محاسبه گردید. (جدول شماره ۲)

جدول شماره ۲: مقایسه روش PCR با روش کشت برای تشخیص لیشمانیوز جلدی در میرجاوه، (۱۳۸۴)

		کشت (NNN)		
		مثبت	منفی	جمع
PCR	مثبت	۲۸	۷	۳۵
	منفی	۹	۱۹	۲۸
	جمع	۳۷	۲۶	۶۳

Se = ۲۸ ÷ (۲۸+۹) = ٪۷۶ ± ۰/۱۶
Sp = ۱۹ ÷ (۷+۱۹) = ٪۷۳ ± ۰/۱۹

بحث

این مطالعه نشان داد که حساسیت هر دو روش میکروسکوپی و PCR از روش کشت پائین تر است اما روش PCR از نظر حساسیت نسبت به روش میکروسکوپی برتری دارد. بعلاوه اینکه مزیت شناسایی گونه انگل نیز اختصاص به روش PCR دارد. گونه انگل قبلا در این منطقه شناسایی نشده بود و نظرات اغلب بر اساس علائم بالینی بود که مواردی را بعنوان سالک شهری و بخشی را بعنوان سالک روستایی معرفی می کردند. گونه انگل شناسایی شده با روش PCR لیشمانیا ماژور (Leishmania major) تشخیص داده شد و این خود دلیلی است بر اینکه بیماری در این منطقه از نوع روستایی است.

ارزشیابی و مقایسه روشهای تشخیصی لیشمانیوز از اهمیت ویژه ای برخوردار است و تصمیم گیری در خصوص اینکه چه روشی برای چه هدفی توصیه گردد هنوز نیازمند اطلاعات دقیق پژوهشی می باشد. در این مطالعه سه روش PCR، میکروسکوپی و کشت از نظر تشخیصی مورد مقایسه قرار گرفتند.

پائین ترین حساسیت (۶۱٪) برای روش میکروسکوپی بدست آمد. اگرچه ویژگی روش میکروسکوپی در مطالعه حاضر ۱۰۰درصد بود اما با توجه به پائین بودن حساسیت آن، این روش برای تشخیص بیماری لیشمانیوز از اعتماد کافی برخوردار نیست. سایر مطالعات نیز حساسیت پائینی را برای این روش گزارش نمودند، بعنوان مثال در مطالعه Aviles و همکاران [۸]، حساسیت میکروسکوپی ۴۲درصد بود. در مطالعه ای در ترکیه، Culha و همکاران تعداد ۲۵ نمونه را مورد مقایسه قرار دادند که با روش میکروسکوپی ۶۸ درصد از آنها تشخیص داده شد و در مقایسه با مطالعه حاضر حساسیت بالاتری را نشان داد، البته به نظر می رسد تعداد نمونه در مطالعه فوق (۲۵ مورد) جهت مقایسه تحلیلی کافی نیست و از طرفی، بیماران مورد مطالعه آنها به لیشمانیوز جلدی نوع شهری مبتلا بودند که عامل آن لیشمانیا تروپیکا است و این گونه از انگل معمولاً به میزان

www.SID.ir

فراوانتری در زخم نسبت به لیشمانیا ماژور (عامل نوع روستایی) وجود دارد. [۱۸] برای روش PCR در مطالعه حاضر حساسیت و ویژگی بترتیب ۷۶٪ و ۷۳٪ نسبت به روش کشت in vitro بدست آمد. در مطالعات دیگر نتایج مشابه یا با کمی تفاوت ارائه شده و گاهی حساسیت و ویژگی بالاتری را نیز گزارش نموده اند. [۱۰-۳] Oliveira و همکاران (۲۰۰۵) [۱۹] در یک ارزشیابی PCR برای تشخیص لیشمانیوز مخاطی ۳۴ مورد از ۳۵ مورد (۹۱/۹۷٪) را تشخیص دادند. Al-Javabreh و همکاران (۲۰۰۶) با استفاده از قطعه ITS1 از DNA رایبوزومی، حساسیت ۸۷ درصد و ویژگی ۱۰۰ درصد برای روش PCR خود گزارش نمودند [۲۰]. همچنین Marques و همکاران (۲۰۰۶)[۲۱] در مطالعه مقایسه روش PCR (قطعه ثابت از kDNA) با روش میکروسکوپی و تست جلدی مونته نگرو (Montenegro skin test) برای تشخیص لیشمانیوز جلدی آمریکایی، دریافتند که روش PCR می تواند بعنوان روشی جایگزین برای تشخیص این نوع بیماری بخصوص برای مواردی که با تست جلدی و مونته نگر و منفی تشخیص داده می شوند بکار رود.

البته ذکر این نکته لازم است که شاید مقایسه نتایج بدست آمده با نتایج مطالعات دیگران به دلایلی در همه موارد از دقت و استدلال کافی برخوردار نباشد اول اینکه در بعضی مطالعات نوع بیماری در منطقه آندمیک مورد مطالعه از نوع لیشمانیوز جلدی شهری و در بعضی مطالعات از نوع روستایی است و اصولاً تعداد انگل (لیشمانیا تروپیکا) در زخم های نوع شهری بیشتر از تعداد انگل (لیشمانیا ماژور) در زخم های نوع روستایی است. () دوم اینکه تعداد انگل موجود در زخم لیشمانیوز معمولاً با پیشرفت دوره زخم کاهش پیدا می کند [۷]، بنابراین این مسئله که در زمان نمونه برداری زخمها در چه مرحله ای قرار داشته اند محل سوال است و فراوانی انگل در نمونه برداشت شده در بیماران متفاوت است و این نیز می تواند منشأ تفاوت در نتایج آزمایشات در مطالعات مختلف باشد. دلیل سوم این است که تفاوت در روش های خالص سازی DNA [۲۲] و همچنین نوع ژن یا قطعه DNA مورد هدف که در مطالعات مختلف استفاده می شوند نیز می تواند از عوامل موثر بر نتایج از جمله حساسیت و ویژگی روش ها باشد.

به نظر می رسد حساسیت و ویژگی مطالعه حاضر برای PCR پائین تر از حد انتظار باشد. دلیل آن می تواند برخی از موارد فوق باشد. شاید یک دلیل آن استفاده از نوع کیت مورد استفاده (DNG-plus) برای استحصال DNA از نمونه های مستقیم در این مطالعه باشد. لذا مقایسه روش کیت مزبور با سایر روش های استحصال DNA بخصوص روش فنل – کلروفرم خالی از فایده نیست. البته این بحث در مقایسه با بعضی مطالعاتی که قبلاً اشاره شد مطرح می گردد ولی مسلم اینست که بر اساس نتایج این مطالعه روش PCR نسبت به روش میکروسکوپی از حساسیت بسیار بالاتری برخوردار است. از طرف دیگر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی می توان همزمان علاوه بر تشخیص بیماری سالک، گونه انگل عامل بیماری و در نتیجه نوع سالک را نیز شناسایی نمود.

بد نیست به این موضوع نیز اشاره گردد که اگر چه تاکنون روش کشت in vitro (در محیط NNN) در مطالعات مختلف از جمله مطالعه حاضر بعنوان استاندارد طلایی مورداستفاده قرار گرفته است، با این حال بعضی اعتقاد دارند که حساسیت و ویژگی روش PCR بالاتر از روش کشت است و برتری آن در حال محرز شدن است، به گونه ای که ممکن است بتدریج جای روش کشت را بعنوان استاندارد طلایی بگیرد [۲۳]. هر چند مطالعاتی نیز حاکی از این است که PCR به تنهایی نمی تواند استاندارد طلایی برای تشخیص باشد.[۲۴]

علیرغم نتایج بسیار با ارزش حاصل از کاربرد روش های مولکولی برای تشخیص لیشمانیوز، باید اذعان نمود که هیچ یک از روش های تشخیصی دیگر از جمله PCR و کشت به

Archive of SID
www.SID.ir

ارزانی و سادگی روش میکروسکوپی نیست. بر اساس نتایج بدست آمده در این مطالعه، این نکته تأکید می گردد که برای هر گونه تصمیم گیری بخصوص درمان بیماران، به پاسخهای منفی گسترش میکروسکوپی نمی توان اکتفا نمود و لذا در مراکزی که موارد زیادی برای تشخیص، درمان و پیگیری سالک مراجعه می نمایند، راه اندازی روش PCR و همچنین روش کشت NNN بعنوان روشهای مکمل بالاخص برای گسترش های منفی و همچنین برای تعیین گونه انگل (که از امتیازات روش PCR اختصاصی بکار رفته در این مطالعه است) قابل توجیه می باشد.

سپاسگزاری

هزینه انجام این مطالعه توسط دانشگاههای علوم پزشکی زاهدان و کرمان در قالب طرح تحقیقاتی بین دانشگاهی تأمین گردیده است. ضمناً، نویسندگان بر خود لازم می دانند که از همکاری صمیمانه مسئولین مرکز بهداشت استان سیستان و بلوچستان و مرکز بهداشت شهرستان زاهدان تشکر نمایند. همچنین از کلیه کارکنان مراکز و خانه های بهداشت شهر و روستاهای میرجاوه بالاخص آقایان فیض محمد شنبه زهی، احمد کردی، کیومرث ریگی، امان ا... ریگی، محمد فیروزی و خانم مهناز نارویی و همچنین مردم عزیز روستاهای منطقه بخصوص روستاهای میل ۷۲ به واسطه همکاریشان صمیمانه قدردانی و تشکر می گردد.

References

1. WHO. The leishmaniases and Leishmania/HIV co-infections. WHO, Fact sheet N 116, 2000. Available from http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs116/en/print.html.
2. Mandell GL, Bennett JE, Dolin. Principles and practice of infectious diseases. 5th ed. Churchill Livingstone, 2000; 2838-2839.
3. Noyes HA, Reyburn H, Bailey JW, et al. A nested-PCR-based schizodeme method for identifying Leishmania kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of Leishmania tropica in Pakistan. J Clin Microbiol 1998; 36(10):2877-2881
4. Mahboudi F, Abolhassan M, Yaran M, et al. Identification and differentiation of Iranian Leishmania species by PCR amplification of kDNA. Scand J Infect Dis 2001; 33(8):596-598.
5. Safaei A, Motazedian MH, Vasei M. Polymerase chain reaction for diagnosis of cutaneous leishmaniasis in histologically positive, suspicious and negative skin biopsies. Dermatology 2002; 205(1):18-24.
6. Rodriguez-Bonfante C, Bonfante-Garrido R, Grimaldi G Jr, et al. Genotypically distinct Leishmania colombiensis isolates from Venezuela cause both cutaneous and visceral leishmaniasis in humans. Infect Genet Evol. 2003; 3(2):119-124.

Archive of SID
www.SID.ir

7. Belli A, Rodriguez B, Aviles H, et al. Simplified polymerase chain reaction detection of new world Leishmania in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg 1998; 58(1):102-109.
8. Aviles H, Belli A, Armijos R, et al. PCR detection and identification of Leishmania parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. J Parasitol 1999; 85(2):181-187.
9. Rodrigues EH, Felinto de Brito ME, Mendonca MG, et al. Evaluation of PCR for diagnosis of american cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity in northeastern Brazil. J Clin Microbiol 2002; 40 (10) :3572-3576.
10. Gangneux JP, Menotti J, Lorenzo F, et al. Prospective value of PCR amplification and sequencing for diagnosis and typing of old world Leishmania infections in an area of nonendemicity. J Clin Microbiol 2003; 41(4):1419-1422.
11. Reithinger R, Espinoza JC, Courtenay O, et al. Evaluation of PCR as a diagnostic mass-screening tool to detect Leishmania (Viannia) spp. in domestic dogs (Canis familiaris).J Clin Microbiol 2003; 41(4):1486-1493.
12. Van Eys GJ, Schoone GJ, Kroon NC, et al. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of Leishmania parasites. Mol Biochem Parasitol 1992; 51:133-142.
13. Alvar J, Molina R, San Andres M, et al. Canine leishmaniasis clinical, parasitological, and entomological follow-up after chemotherapy. Ann Trop Med Parasitol 1994; 88:371-378.
14. Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of Leishmania. Exp Parasitol 1990; 71(3):267-275.
15. Schonian G, Nasereddin A, Dinse N, et al. PCR diagnosis and characterization of Leishmania in local and imported clinical samples. Diagn Microbiol Infect Dis 2003; 47(1):349-358.
16. Wassertheil-Smoller S. Biostatistics and epidemiology, a primer for health and biomedical professionals, 3rd ed. Springer, 2003; 129-132.
17. Romero GA, Guerra MV, Paes MG, et al. Sensitivity of the polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to Leishmania (Viannia) guyanensis. Acta Trop 2001; 79(3):225-259.

Archive of SID

www.SID.ir

18. Culha G, Uzun S, Ozcan K, et al. Comparison of conventional and polymerase chain reaction diagnostic techniques for leishmaniasis in the endemic region of Adana, Turkey. Int J Dermatol 2006; 45(5):569-572.

19. Oliveira JG, Novais FO, de Oliveira CI, et al. Polymerase chain reaction (PCR) is highly sensitive for diagnosis of mucosal leishmaniasis. Acta Trop 2005; 94:55-59.

20. Al-Jawabreh A, Schoenian G, Hamarsheh O, et al. 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.

21. Marques MJ, Volpini AC, Machado-Coelho GL, et al. Comparison of polymerase chain reaction with other laboratory methods for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis: diagnosis of cutaneous leishmaniasis by polymerase chain reaction. Diagn Microbiol Infect Dis 2006; 54(1):37-43.

22. Reithinger R, Lambson BE, Barker DC, et al. Use of PCR to detect Leishmania (Viannia) spp. in dog blood and bone marrow. J. Clin Microbiol 2000; 38(2):748-51. Erratum in: J Clin Microbiol 2000; 38(8):3141.

23. Vega-Lopez F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. Curr Opin Infect Dis 2003; 16(2):97-101.

24. Reithinger R, Davies CR. American cutaneous leishmaniasis in domestic dogs: an example of the use of the polymerase chain reaction for mass screening in epidemiological studies. Trans R Soc Trop Med Hyg 2002; 96 Suppl 1: 123-126.

Archive of SID

www.SID.ir

Evaluation of a direct PCR in comparison with routine microscopy and In vitro culture for diagnosis of cutaneous leishmaniasis.

Fouladi B, MSc*; Sharifi I, PhD; Hashemi Shahri M, MD***; Moradgholi HR, BSc****; Sarabandi-No A, MSc*****; Ebrahimzadeh A, PhD***; Fazaeli A, PhD***.**

Background: *Cutaneous leishmainasis (CL) is highly prevalent in several provinces of Iran, having increased during the recent decades. The diagnosis of CL in most of clinical laboratories is usually performed using routine microscopy. However, this method is not sensitive enough, and the assessment and utilization of other methods, including a variety of PCR techniques, have been taken to consideration. In the present study, a direct PCR, based on kDNA primers, in comparison with the microscopic examination and in vitro NNN culture was evaluated for the detection of CL.*

Materials & Methods: *The scrapings were taken from 73 patients from Mirjaveh, Sistan & Baluchestan province, and subjected to the comparative diagnoses.*

Results: *The results showed that 38.4%, 55.5% and 63.2% of the specimens were positive by microscopy, PCR and NNN culture, respectively. The parasite species were also characterized by the current PCR. Separate comparisons of both microscopy and PCR methods with NNN culture, showed that the sensitivity of the PCR (76%) is higher than that of microscopy (61%). The calculated specificity, however, was 100% for microscopy and 73% for PCR.*

Conclusion: *In addition to the higher sensitivity, this particular PCR, which uses species-specific primers, has a major advantage of identification of Leishmania species at the same time. It is, therefore, concluded that this PCR technique can be a suitable complement to the routine microscopic examination for diagnosis and identification of the parasite species from suspected leishmaniasis.*

KEY WORDS: *Cutaneous leishmaniasis, PCR, Detection.*

*** Dept of Parasitology, Faculty of Medicine, Zabol University of Medical Sciences and Health Services Zabol, Iran.**
**** Kerman Research Center for Leishmaniasis, Kerman University of Medical Sciences and Health Services Kerman, Iran**
*****Zahedan Research Center for Infectious Diseases and Tropical Medicine, Zahedan University of Medical Sciences and Health Services Zahedan, Iran.**
******Zahedan Center for Health Services**
*******Zahedan Islamic Azad University**

Archive of SID
www.SID.ir