مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان / بهار ۱۳۹۰ / دوره ۱۳ / شماره ۱ (پی در پی ۳۷) / صفحات ۵۹ تا ۶۵
Archive of SID

تحقیقی

تعیین گونه انگل عامل بیماری لیشمانیوز جلدی به روش Nested PCR در شهرستان دامغان (سال ۱۳۸۷)

صادق محمدی ازنی[۱]، دکتر یاور راثی*[۲]، دکتر محمدعلی عشاقی[۳]، دکتر محمدرضا یعقوبی ارشادی[۲]، دکتر مهدی محبعلی[۴]
محمدرضا عبایی[۵]، فاطمه محترمی[۵]، زینب نوکنده[۶]، سینا رفیع زاده[۷]، قربان محمد خجمی[۸]

۱- کارشناس ارشد حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین ، مرکز بهداشت شهرستان دامغان ، دانشگاه علوم پزشکی سمنان. ۲- استاد گروه حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین ، دانشکده بهداشت ، دانشگاه علوم پزشکی تهران. ۳- دانشیار گروه حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین ، دانشکده بهداشت ، دانشگاه علوم پزشکی تهران. ۴- استاد گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی ، دانشکده بهداشت ، دانشگاه علوم پزشکی تهران. ۵- مربی گروه حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین ، دانشکده بهداشت ، دانشگاه علوم پزشکی تهران. ۶- کارشناس میکروب‌شناسی ، مرکز بهداشت شهرستان دامغان ، دانشگاه علوم پزشکی سمنان. ۷- کارشناس اداره سوانح و حوادث، وزارت بهداشت ، درمان و آموزش پزشکی. ۸- کاردان آزمایشگاه ، مرکز بهداشت شهرستان دامغان ، دانشگاه علوم پزشکی سمنان.

چکیده

زمینه و هدف : *بیماری لیشمانیوز جلدی از بیماری‌های بومی کشور بوده که به دو صورت شهری و روستایی در نیمی از استان‌های کشور به عنوان مشکل بهداشتی مطرح است. شناسایی گونه انگل و نوع بیماری اهمیت زیادی برای درمان بیماران و نیز کنترل بیماری دارد. معمولی‌ترین روش تشخیص، تهیه نمونه از زخم و بررسی میکروسکوپیک آن است؛ اما با این روش تعیین گونه انگل امکان‌پذیر نیست و استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی ضرورت دارد. این مطالعه به منظور تعیین گونه انگل عامل بیماری لیشمانیوز جلدی به روش Nested PCR در شهرستان دامغان انجام شد.*

روش بررسی : *این مطالعه توصیفی روی ٦٧ بیمار مبتلا ضایعات پوستی مراجعه کننده به آزمایشگاه مرکز بهداشت شهرستان دامغان در سال ۱۳۸۷ انجام شد. اطلاعات مربوط به افراد در فرم اطلاعاتی ثبت و سپس مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت. DNA از لام‌های بیماران استخراج شد و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی kinetoplast DNA به روش Nested PCR ارزیابی گردید.*

یافته‌ها : *وجود انگل لیشمانیا در ۵۷ بیمار با مشاهده میکروسکوپی محرز گردید. ۱۰بیمار دیگر به سایر بیماری‌های پوستی مبتلا بودند. نتایج PCR نشان داد که انگل موجود در زخم‌های ۵۷ بیمار، از نوع لیشمانیا ماژور بوده و ۱۰ لام دیگر نیز از نظر وجود انگل لیشمانیا منفی گزارش گردید. ٥٤درصد بیماران مذکر و ٤٦درصد مونث بودند. ۷۲درصد بیماران در مناطق روستایی سکونت داشتند. بیشترین فراوانی در گروه سنی بیش از ۲۵ سال به میزان ۵۰/۹درصد مشاهده شد. بیشترین فراوانی زخم‌ها در دست‌ها (٤٤/٧درصد) مشاهده گردید. ٤٧/٤ درصد بیماران یک زخم و ٥٢/٦درصد دو زخم یا بیشتر داشتند. بیشترین میزان شیوع بیماری در مهر ماه (٣١/٦درصد) تعیین شد.*

نتیجه‌گیری : *این مطالعه نشان داد که بیماری لیشمانیوز جلدی از نوع مرطوب در این منطقه شایع است و روش Nested PCR برای تعیین گونه انگل لیشمانیا، روشی حساس و دقیق می‌باشد.*

کلید واژه‌ها : *بیماری لیشمانیوز جلدی ، انگل لیشمانیا ، Nested PCR ، دامغان*

* نویسنده مسؤول : دکتر یاور راثی ، پست الکترونیکی : rassiy@sina.tums.ac.ir
نشانی : تهران ، دانشگاه علوم پزشکی تهران ، دانشکده بهداشت ، گروه حشره شناسی پزشکی ومبارزه با ناقلین ، تلفن و نمابر ۸۸۹۵۱۳۹۳-۰۲۱
وصول مقاله : ۸۸/۱۱/۲۷ ، اصلاح نهایی : ۸۹/۵/۳۱ ، پذیرش مقاله : ۸۹/۷/۳

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

بیماری لیشمانیوز جلدی (سالک) یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مشترک بین انسان و حیوان است که توسط چندین گونه انگل لیشمانیا ایجاد می‌شود (۱). این بیماری در بسیاری از نقاط دنیا به عنوان مشکل بهداشتی مطرح می‌باشد و در بیش از ۸۸ کشور جهان دیده شده است (۲). در بیش از نیمی از استان‌های کشور ایران نیز این بیماری به صورت بومی وجود داشته و ابتلای سالیانه بیش از ۲۰هزار نفر گزارش می‌شود (۳و۴). عامل بیماری توسط گزش گونه‌هایی خاص از پشه خاکی به میزبان‌های مختلف منتقل می‌شود (۵).

بیماری لیشمانیوز جلدی به دو شکل شهری (خشک) و روستایی (مرطوب) یا (Zoonotic Cutaneous Leishmanianisis) در ایران وجود دارد. در نوع مرطوب که در اثر لیشمانیا ماژور به‌وجود می‌آید؛ جوندگان به عنوان مخزن مطرح هستند و ناقل اصلی بیماری پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی است. در نوع خشک که عامل آن لیشمانیا تروپیکا است؛ مخزن اصلی بیماری انسان و ناقل اصلی فلبوتوموس سرژانتی می‌باشد. در ایران علاوه بر فلبوتوموس پاپاتاسی و فلبوتوموس سرژانتی ناقلین دیگری نیز در انتقال لیشمانیوز جلدی روستایی و شهری نقش دارند (۱و۴و۹-۶). باتوجه به خصوصیات بیولوژیک انگل، مخازن و ناقلین روش‌های مبارزه با این دو نوع بیماری متفاوت می‌باشد و شناسایی گونه انگل و در نهایت نوع بیماری در برنامه‌ریزی‌های بهداشتی اهمیت به‌سزایی دارد (۱۰). بامشاهدات میکروسکوپی می‌توان به وجود آلودگی و حضور انگل پی‌برد؛ اما شناسایی دقیق گونه انگل امکان‌پذیر نمی‌باشد. روش استاندارد و طلایی جداسازی، کشت، تزریق به حیوانات حساس آزمایشگاهی و به دنبال آن استفاده از روش ایزوآنزیم می‌باشد که نیازمند مقدار زیادی انگل است که جداسازی و کشت انگل دشواری‌هایی از قبیل آلودگی‌های ثانویه را داشته و آنالیز ایزوآنزیم‌ها افزون بر صرف هزینه، وقت‌گیر می‌باشد (۱۳-۱۱). روش‌های متکی بر DNA که در تشخیص بیماری لیشمانیوز و شناسایی گونه‌های انگل در سال‌های اخیر بسیار رواج یافته است؛ این مزیت را دارند که حتی با تعداد کم انگل نیز آلودگی را نشان داده و گونه انگل را مشخص می‌سازند. لذا استخراج DNA از لام‌های رنگ‌آمیزی شده با گیمسا و انجام واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرازی (PCR) کارایی خوبی دارند. زیرا مشکلات مربوط به آلودگی محیط کشت و تکثیر زیاد را نداشته و می‌توان مستقیماً با استفاده از مقدار کمی بافت آلوده از روی لام، انگل را تعیین هویت نمود (۱۲و۱۴).

برای مطالعات مولکولی قسمت‌های مختلف ژنوم انگل لیشمانیا استفاده می‌شود (۱۴و۱۵). یکی از قسمت‌های ژنوم که استفاده می‌شود؛ مربوط به DNAکینتوپلاست است که در واقع همانminicircle kDNA یا حلقه‌های کوچک می‌باشند. زیرا این حلقه‌ها به تعداد ۱۰۰۰۰کپی در هر سلول لیشمانیا وجود دارند و برای تشخیص آلودگی حتی اگر تعداد انگل در نمونه مورد نظر بسیار کم باشد نیز مفید است (۱۱و۱۶).

قبل از سال ۱۳۷۸ موارد لیشمانیوز جلدی در شهرستان دامغان بسیار کم و هر ساله کمتر از ۵ مورد بود و تمامی آنها از دیگر مناطق این شهرستان منتقل شده بودند؛ اما بیماری لیشمانیوز در سال ۱۳۷۸ در شهرستان دامغان به صورت اپیدمی بروز کرد. به طوری که ۹۳۷ نفر را مبتلا ساخت و هرساله افراد زیادی به آن مبتلا می‌شوند. ازآنجا که مطالعه جامعی در خصوص تعیین گونه انگل با روش‌های مولکولی در این شهرستان انجام نشده بود؛ این مطالعه به منظور تعیین شیوع لیشمانیوز جلدی، شناسایی گونه انگل در زخم بیماران، تعیین نوع بیماری و بررسی خصوصیات اپیدمیولوژیک بیماری در مراجعین به آزمایشگاه مرکز بهداشت دامغان با استفاده از روش Nested PCR و تکثیر kDNA (۱۷) انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی روی ۶۷ بیمار مبتلا به ضایعات پوستی مراجعه کننده به آزمایشگاه مرکز بهداشت شهرستان دامغان در سال ۱۳۸۷ انجام شد. مراجعه بیماران از مرداد ماه شروع شد و تا پایان دی ماه ادامه داشت. به منظور تعیین هویت انگل از تمامی مراجعین مشکوک به بیماری لیشمانیوز جلدی در آزمایشگاه مرکز بهداشت شهرستان دامغان نمونه‌برداری به عمل آمد. همچنین ضایعات و زخم‌های بیماران مورد معاینه دقیق قرار گرفت و پرسشنامه‌های مخصوص برای هر فرد مشکوک تکمیل گردید. این پرسشنامه حاوی اطلاعاتی از قبیل نام و نام‌خانوادگی، سن، جنس، ملیت، محل سکونت،

www.SID.ir

Archive of SID

تعداد و محل زخم و یا زخم‌ها بود. سپس از تمامی افراد دارای زخم مشکوک به بیماری لیشمانیوز جلدی لام تهیه شد و پس از رنگ‌آمیزی به روش گیمسا در زیر میکروسکوپ به جستجوی انگل لیشمانیا پرداختیم. لام‌ها پس از بررسی میکروسکوپی از نظر آلودگی به اجسام لیشمن، برای انجام آزمایشات مولکولی در فرایند استخراج DNA قرار گرفتند. برای این کار از کیت مخصوص استخراج DNA از بافت(Bioneer;South Korea) استفاده شد. در این مطالعه، برای تشخیص گونه انگل از روش حساس Nested PCR استفاده گردید و بدین منظور از پرایمرهای طراحی شده توسط Noyes و همکاران استفاده شد (۱۷). با این روش با تکثیر minicircle kDNA می‌توان گونه‌های مختلف ایجاد کننده بیماری را با استفاده از Nested PCR شناسایی نمود. این پرایمرها که براساس ناحیه حفاظت شده حلقه‌های کوچک kDNA (Minicircle) طراحی شده‌اند؛ برای انگل‌های L.infantum و L.donovani محصول PCR به طول ۶۸۰ bp، برای انگل L.tropica طول باند ۷۵۰ bp و برای انگل L. major طول باند ۵۶۰bp را ایجاد می‌نمایند (۱۷).

Nested PCR واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی دو مرحله‌ای می‌باشد (۱۷و۱۸). مواد لازم برای مرحله نخست برای هر نمونه شامل Taq DNA Polymerase هفتاد وپنج درصد یونیت، بازهای دئوکسی نوکلئوتید ۲/۵میلی‌مول، کلرومنیزیوم ۲ میلی‌مول، بافر PCR ۲/۵ میکرولیتر، میزان ۷-۲ میکرولیتر DNA و ۴۰ نانوگرم از آغازگرهای زیر بود.

CSB2XF(C/GA/GTA/GCAGAAAC/TCCCGTTCA)
CSB1XR(ATTTTTCG/CGA/TTTT/CGCAGAACG)

حجم نمونه را با اضافه کردن مقدار مناسب ddH2O به ۲۰ میکرولیتر رسانده و در دستگاه Thermocycler با مشخصات Ependorf مدل Personal برنامه حرارتی زیر برای تکثیر قطعه خالص DNA استفاده شد:

مرحله اول: دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه

مرحله دوم که ۳۰ بار تکرار گردید: ۱- دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه؛ ۲- دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و ۳- دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ثانیه.

از محصول PCR به دست آمده در این مرحله برای PCR مرحله دوم استفاده شد و مواد به‌کار رفته همانند مرحله اول بود؛ با این تفاوت که به جای DNA به‌دست آمده از بیماران، از محصول PCR مرحله نخست با رقت یک به ده استفاده گردید. آغازگرهای این مرحله شامل موارد زیر بود:

13Z (ACTGGGGGTTGGTGTAAAATAG)
LiR (TCGCAGAACGCCCCT)

حجم نهایی نمونه را به ۳۰ میکرولیتر رسانده و برنامه PCR همانند مرحله اول اجرا شد.

پس انجام PCR، محصول بر روی ژل آگارز یک درصد حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز شدند. سپس بر روی دستگاه ایلومیناتور گذاشته و در صورت مشاهده باندهای DNA، از آن عکسبرداری شد و با توجه به شاخص وزنی محصولات PCR گونه انگل تشخیص داده شد. نتایج به‌دست آمده از تعیین گونه انگل در پرسشنامه مربوط به بیماران ثبت گردید. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-ver13 و آزمون کای‌اسکوئر تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این مطالعه ۶۷ بیمار بررسی و وجود انگل لیشمانیا در ۵۷بیمار با مشاهده میکروسکوپی محرز گردید. ۱۰ بیمار دیگر به سایر بیماری‌های پوستی مبتلا بودند. پس از الکتروفورز محصولات PCR نمونه‌های ۵۷ بیمار باندهای مشاهده شده ۵۶۰bp بود که مبین آلودگی به انگل لیشمانیا ماژور می‌باشد (تصویر یک). آزمایش PCR مربوط به ۱۰ بیمار دیگرکه در مشاهدات میکروسکوپی فاقد انگل لیشمانیا بودند؛ نیز منفی شد.

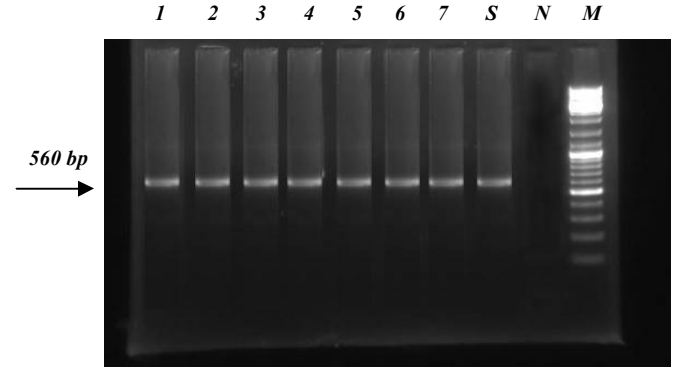
از تعداد کل ۵۷بیمار، ۳۱ نفر (۵۴درصد) مرد و ۲۶ نفر (۴۶درصد) زن بودند. بین جنس و ابتلاء به بیماری اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد.

۵۵ نفر از بیماران ایرانی (۹۶/۵درصد) و ۲ نفر (۳/۵درصد) ملیت افغانی داشتند. ۷۲درصد بیماران در مناطق روستایی و ۲۸درصد در مناطق شهری سکونت داشتند. کمترین موارد بیماری به میزان ۵/۳درصد در گروه‌های سنی ۴-۰ و ۹-۵ سال و بیشترین موارد بیماری به میزان ۵۰/۹ درصد در گروه سنی

www.SID.ir

Archive of SID

۲۵ سال و بالاتر مشاهده شد (جدول یک).



تصویر ۱ : الکتروفورز نمونه‌های PCR شده بر روی ژل آگارز ۱درصد. شماره‌های ۷-۱ مربوط به انسان به طول ۵۶۰bp ، S کنترل مثبت (نمونه استاندارد: L.major MHOM/IR/54/LV 39)، N کنترل منفی و M سایزمارکر ۱۰۰bp (سیناژن: ایران)

جدول ۱ : فراوانی زخم حاد در گروه‌های سنی مختلف در مراجعین به آزمایشگاه مرکز بهداشت شهرستان دامغان در سال ۱۳۸۷

گروه سنی (سال)	تعداد(درصد)
۰-۴	۳ (۵/۳)
۵-۹	۳ (۵/۳)
۱۰-۱۴	۶ (۱۰/۵)
۱۵-۱۹	۷ (۱۲/۳)
۲۰-۲۴	۹ (۱۵/۸)
۲۵ و بیشتر	۲۹ (۵۰/۹)

مراجعه بیماران از مرداد ماه شروع شد و تا آذر ماه ادامه یافت. بیشترین فراوانی در مهرماه با میزان ۳۱/۶درصد مشاهده گردید و این میزان در ماه‌های مرداد، شهریور، آبان و آذر به ترتیب ۳/۵ درصد، ۱۴ درصد، ۲۹/۸ درصد و ۲۱/۱ درصد تعیین شد.

از نظر موقعیت آناتومیکی ضایعه در بدن، زخم‌ها به ترتیب در دست (۴۴/۷درصد)، پا (۳۲/۵درصد)، صورت (۱۲/۳درصد) و سایر نقاط بدن (۱۰/۵درصد) مشاهده شد. بین جنسیت و محل زخم ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد (جدول۲). در بین بیماران ۴۷/۴درصد یک زخم، ۲۸درصد دو زخم و ۲۴/۶درصد دارای سه زخم و یا بیشتر بودند.

جدول ۲ : فراوانی محل زخم حاد برحسب جنس در مراجعین به آزمایشگاه مرکز بهداشت شهرستان دامغان در سال ۱۳۸۷

محل زخم / جنس	دست تعداد (درصد)	پا تعداد (درصد)	صورت تعداد (درصد)	سایر اندام‌ها تعداد (درصد)
مرد	۱۵ (۴۸/۴)	۱۰ (۳۲/۲۵)	۴ (۱۲/۹)	۲ (۶/۴۵)
زن	۱۱ (۴۲/۳)	۸ (۳۰/۸)	۳ (۱۱/۵)	۴ (۱۵/۴)

بحث

این مطالعه نشان داد که ۵۷ نفرآلوده به انگل لیشمانیا از نوع ماژور بودند و نتیجه PCR نیز این یافته را تایید نمود. این انگل عامل لیشمانیوز جلدی نوع مرطوب می‌باشدکه مخزن بیماری جوندگان صحرایی و ناقل اصلی آن پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی می‌باشد (۱و۴و۱۹).

در این بررسی ۵۴درصد بیماران مذکر و ۴۶درصد آنان مونث بودند و بین جنس و ابتلاء به بیماری اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد.

برخلاف مطالعه انجام شده اصفهان به عنوان کانون هیپراندمیک که بیشترین موارد ابتلاء در کودکان کمتر از ۵سال گزارش شد (۲۰)؛ در مطالعه ما بیشترین موارد ابتلاء (۵۰/۹ درصد) در گروه سنی ۲۵ سال و بالاتر بود که با توجه به این شواهد به نظر می‌رسد؛ این منطقه از نظر اپیدمیولوژیک هیپواندمیک می‌باشد.

با توجه به ابتلاء ۲۸ درصد از ساکنین شهر در این مطالعه، رفت و آمد آنان به مناطق روستایی؛ می‌تواند از علل ابتلاء به بیماری لیشمانیوز جلدی مرطوب باشد. لذا آموزش بهداشت در خصوص آشنایی با بیماری و روش‌های حفاظت شخصی در ساکنین مناطق شهری ضروری است.

شیوع لیشمانیوز جلدی نوع مرطوب در ماه‌های مختلف سال تغییرات واضحی دارد و در فصل پاییز بالاترین مقدار را دارد (۱و۴و۶). در مطالعه حاضر نیز بیشترین میزان شیوع به ترتیب در ماه‌های مهر، آبان و آذر بود که با نتایج تحقیقات دیگر در سایر نقاط کشورمان مطابقت داشت (۲۳-۲۱).

در این مطالعه بیشترین فراوانی آناتومیکی زخم‌ها در اعضای بدن به ترتیب در دست، پا و صورت مشاهده گردید. این یافته با سایر تحقیقات در کانون‌های لیشمانیوز نوع مرطوب کشورمان مطابقت دارد (۸و۲۳-۲۰). با توجه به عدم توانایی خونخواری پشه خاکی ناقل از روی لباس، بیشتر نقاط باز بدن مورد گزش قرار گرفته و فراوانی زخم در دست، پا و صورت نیز به همین دلیل می‌باشد (۴و۲۴و۲۵).

در این مطالعه ۴۷/۴درصد بیماران یک زخم، ۲۸درصد دو زخم و ۲۴/۶درصد دارای سه زخم و یا بیشتر بودند. با توجه به سایر مطالعات (۲۷-۲۴) که مبتلایان به بیماری لیشمانیوز

www.SID.ir

Archive of SID

جلدی بیش از یک زخم در بدن داشتند؛ می‌توان نتیجه گرفت که پشه‌خاکی هنگام تغذیه از میزبان به دلیل خصوصیات فیزیولوژیک بیش از یک بار میزبان را مورد گزش قرار داده و در هر گزش تعدادی انگل وارد بدن میزبان شده و زخم‌های متعددی ایجاد می‌گردد.

براساس نتایج این مطالعه مشاهده میکروسکوپی برای اثبات وجود انگل لیشمانیا مناسب است؛ اما برای تایید گونه آن نیاز به یک روش تکمیلی است که روش Nested PCR در این مطالعه کارایی خوبی داشت و یکی از مزیت‌های این روش آن است که به اقدامات بعدی مانند تعیین توالی نیاز ندارد. لذا از این روش می‌توان علاوه بر بررسی عفونت انسانی، برای دیگر مطالعات اپیدمیولوژیک لیشمانیوز از جمله تشخیص آلودگی ناقلین و مخازن بیماری استفاده کرد. گران بودن و در دسترس نبودن در تمامی شرایط از محدودیت‌های این روش می‌باشد.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که بیماری لیشمانیوز جلدی از نوع مرطوب در این منطقه شایع است و روش Nested PCR برای تعیین گونه انگل لیشمانیا، روشی حساس و دقیق می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین و نیز حاصل طرح تحقیقاتی دانشگاه علوم پزشکی تهران (شماره مصوب ۶۷۳۰) بود. بدین‌وسیله از مسؤولین و کارکنان دانشگاه علوم پزشکی تهران و نیز مرکز بهداشت شهرستان دامغان تشکر ویژه به‌عمل می‌آید.

References

1. Ardahali S, Rezaei H, Nadim A. [Leishmania and Leishmaniasis]. 2nd. Tehran: Nashre Daneshgahi Center Press. 1994; pp:162-86. [Persian]

2. First meeting of the Scientific Working Group on Leishmaniasis. Geneva, Switzerland. 2-4 February 2004.

3. Akhavan AA, Yaghoobi-Ershadi MR, Hasibi F, Jafari R, Abdoli H, Arandian MH, Soleimani H. Epidemiological survey in a new focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Southern Iran. Proceeding of 11th International Congress of Parasitology (ICOPA), Glasgow Scotland. 2006.

4. Rassi Y, Hanafi bojd AA. [Sand fly, The vector of leishmaniasis]. 1st. Tehran: Noavaran Elm Publication. 2006; p:251. [Persian]

5. Killick-Kendrick R. The biology and control of phlebotomine sand flies. Clin Dermatol. 1999 May-Jun;17(3):279-89.

6. Nilforushzadeh MA, Sadeghian G. [Cutaneous Leishmaniasis]. 1st. Tehran: Oruj Publication. 2002; pp: 38-52. [Persian]

7. 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 Mar;23(3):291-4.

8. Rassi Y, Sofizadeh A, Abai MR, Oshaghi MA, Rafizadeh S, Mohebail M, et al. Molecular detection of Leishmania major in the vectors and reservoir hosts of cutaneous Leishmaniasis in Kalaleh district, Golestan Province, Iran. Iranian Journal of Arthropod-Borne Diseases. 2008;2(2):21-7.

9. Rassi Y, Javadian E, Amin M, Rafizadeh S, Vatandoost H, Motazedian H. Meriones libycus is the main reservoir of zoonotic cutaneous leishmaniasis in south Islamic Republic of Iran. East Mediterr Health J. 2006 May-Jul;12(3-4):474-7.

10. [No authors listed] Control of the leishmaniases. Report of a WHO Expert Committee. World Health Organ Tech Rep Ser. 1990;793:1-158.

11. 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 May;66(5):1933-8.

12. Singh S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. Indian J Med Res. 2006 Mar;123(3):311-30.

13. Hatam GR, Ardehali S, Motazedian MH, Sadjadi M, Fakorziba MR. [The methods of isolation and characterization of Leishmania parasites]. 1sd. Shiraz: Publication of Medical Science University of Shiraz. 2005; p: 175. [Persian]

14. Alvar J, Barker JR. Molecular tools for epidemiological studies and diagnosis of leishmaniasis and selected other parasitic diseases. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2002;96(1):1-250.

15. Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F. Leishmania and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. Adv Parasitol. 2007;64:1-109.

16. Parvizi P, Mauricio I, Aransay AM, Miles MA, Ready PD. First detection of Leishmania major in peridomestic Phlebotomus papatasi from Isfahan province, Iran: comparison of nested PCR of nuclear ITS ribosomal DNA and semi-nested PCR of minicircle kinetoplast DNA. Acta Trop. 2005 Jan;93(1):75-83.

17. Noyes HA, Reyburn H, Bailey JW, Smith D. 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 Oct;36(10):2877-81.

18. Kokozidou M. Evaluation of PCR methods for detection, species identification and determination of genetic variation in L. infantum. Thesis for PhD. Giessen (Germany). Justus-Liebig-

www.SID.ir

Archive of SID

University Giessen. 2003.

19. Bray RS. Note on the history of cutaneous leishmaniasis in the Mediterranean and Middle East area. Parassitologia. 1987 May-Dec;29(2-3):175-9.

20. Yaghoobi-Ershadi MR. [Study of current statue of cutaneous leishmanisis epidemiology in parts of Isfahan focuses for design and proposal control programme]. Thesis for PhD Medical Entomology. Health school and health research institute. N. 2067. 1994.

21. Rasi Y, Javadian E, Jalali M, Motazedian MH, Vatndoost H. Investigation on zoonotic cutaneous Leishmaniasis, Southern Iran. Irannian Journal of Public Health. 2004; 33(1): 31-5.

22. Hamzavi Y, Mohebali M, Edirissian GhH, Foruzani A. An epidemiological study of cutaneous leishmaniasis (human beeing and animal reservoir) in Dashtestan and Dashti districts, Bushehr province, Iran (1998-99). Iranian J Publ Health. 2000; 29(1-4); 177-9.

23. Yaghoobi-Ershadi MR, Hanafi-Bojd AA, Akhavan AA, Zahraei-Ramazani AR, Mohebali M. [Cutaneous leishmaniosis in Ardestan town]. Hakim Research Journal. 1999, 1(3):206-15. [Article in Perisan]

24. Dejeux P. Information on the epidemiology and control of the leishmaniasis, by country or territory. Geneva, World Health Organization, 1991 (WHO/LEISH/91.30).

25. Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniases: a review. Med Vet Entomol. 1990 Jan;4(1):1-24.

26. Lane RP. Phlebotominae sandflies, Family: Psychodidae, Subfamily Phlebotominae, Important genus: Phlebotomus (Old World) and Lutzomyia (New World). In: Manson-Bahr PEC, Bell DR. Manson's Tropical Diseases. 19th. London: WB Saunders. 1987; pp:1395-1404.

27. Dedet JP, Pratlong F. Leishmaniasis. In: Cook GC, Zumla A. Manson's Tropical Diseases. 21st. Philadelphia: Saunders Company. 2002;pp:1339-64.

www.SID.ir

Archive of SID

Original Paper

Determination of parasite species of cutaneous leishmaniasis using Nested PCR in Damghan – Iran, during 2008

**Mohammadi Azni S (MSc)[1], Rassi Y (PhD)*[2], Oshaghi MA (PhD)[3]
Yaghoobi Ershdi MR (PhD)[2], Mohebali M (PhD)[4], Abai MR (MSc)[5]
Mohtarami F (MSc)[5], Nokandeh Z (BSc)[6], Rafizadeh S (BSc)[7], Khojami GhM[8]**

[1]MSc of Medical Entomology and Vector Control, Semnan University of Medical Sciences, Damghan, Iran. [2]Professor, Department of Medical Entomology and Vector Control, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. [3]Associtae Professor, Department of Medical Entomology and Vector Control, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. [4]Professor, Department of Medical Parasitology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. [5]Academic Instructor, Depatment of Medical Entomology and Vector Control, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. [6]BSc of Microbiology, Damghan Health Center, Semnan University of Medical Sciences, Damghan, Iran. [7]Emegency Center of Medicine, Ministry of Health and Medical Education, Terhan, Iran. [8]Technician of Laboratory Sciences, Damghan Health Center, Semnan University of Medical Sciences, Damghan, Iran.

Abstract

Background and Objective: Cutaneous leishmaniases with two forms of rural and urban is the endemic diseases and as a health problem in our country. Identification of parasite species and type of disease is very important for treatment of disease as well as for planning of control program. The microscopic observations by Giemsa-stained smears is the most common laboratory test for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis, but the determination of parasite species is impossible and utilization of other ways such as biochemical and molecular methods is required. This study was carried out to determine the parasite species caused cutaneous Leishmaniasis by Nested PCR in Damghan, Iran.

Materials and Methods: This descriptive study was performed on 67 patients with dermal lesions that referred to Damghan health center laboratory in Iran during 2008. The patient's information were recorded in questionnaire. DNA of Giemsa-stained slides from patients was extracted and evaluated by specific primers of kinetoplast DNA using Nested PCR.

Results: Leishmania parasites were observed in 57 patients under light microscope. The 10 patients were infected by other dermal diseases. The PCR result showed the parasite presence in lesions of 57 patients is Leismania major. 54% of patients were male and 46% were female. 72% of the patients were lived in rural areas. 50.9% of disease was observed in over 25 years old patients. Hands were the most common region of ulcer (44.7%). 48% of the patients had one ulcer and the other patients had two or more ulcers. High prevalence (31.6%) of disease was observed in October.

Conclusion: This study showed that zoonotic cutaneous leishmaniasis to be prevalent in this area and Nested PCR method is a sensitive and accurate to leishmania species characterization.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis, Leishmania parasite, Nested PCR, Iran

*** Corresponding Author: Rassi Y (PhD), E-mail: rassiy@sina.tums.ac.ir**

Received 16 February 2010 **Revised** 22 August 2010 **Accepted** 25 September 2010

This paper should be cited as: Mohammadi Azni S, Rassi Y, Oshaghi MA, Yaghoobi Ershdi MR, Mohebali M, Abai MR, Mohtarami F, Nokandeh Z, Rafizadeh S, Khojami GhM. [Determination of parasite species of cutaneous leishmaniasis using Nested PCR in Damghan – Iran, during 2008]. J Gorgan Uni Med Sci. Spring 2010;13(1):59-65. [Article in Persian]
www.SID.ir