شیوع لیشمانیوز جلدی و جداسازی انگل لیشمانیا از بیماران مبتلا به سالک در روستاهای مرزی شهرستان گنبدکاووس به روش PCR در سال‌های ۱۳۸۵-۱۳۸۶

فاطمه مسگریان،[۱] نورینا رهبریان،[*۲و۳] مهناز محمودی‌راد،[۴] هما حجاران،[۵] فریده شهبازی،[۳] زهرا مسگریان،[۱] نیلوفر تقی‌پور[۳]

۱- مرکز بهداشت گنبدکاووس، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گلستان، ایران.

۲- مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و ملکولی
۳- گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی
۴- مرکز تحقیقات پوست

دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی، تهران، ایران.

۵- گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

[*] نویسنده مسئول: تهران، اوین، دانشگاه علوم‌پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و ملکولی تلفن: ۲۳۸۷۲۵۶۳
email: n.rahbarian@cmbrc.org

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۰۲/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۰۳/۲۹

چکیده

زمینه و هدف: لیشمانیوز جلدی در اکثر شهرهای ایران به طور اندمیک دیده می‌شود. شهرستان گنبدکاووس از جمله کانون‌های آلوده قدیمی است. چون مطالعه جامعی در این زمینه در این منطقه نشده بود این پژوهش به منظور بررسی تعیین شیوع لیشمانیوز جلدی در روستاهای مرزی این شهرستان به روش PCR انجام گرفت. ***روش بررسی:*** به منظور تعیین شیوع بیماری در بین ساکنین روستاهای مورد مطالعه طی ماه‌های آبان، آذر و دی در سال ۱۳۸۵جمعاً ۶۹۹۰ نفر مورد بررسی قرار گرفتند. برای شناسایی گونه‌های لیشمانیا، ابتدا نواحی ITS1 و ITS2 در ریبوزومال DNA چهل و شش لیشمانیای ایزوله شده از بیماران به روش PCR تکثیر گردید و محصول ITS-PCR با الکتروفورز روی آگاروز ۱/۵٪ جدا شد (۲۰۰ میلی‌آمپر، ۱۴۰ ولت). سپس با رنگ‌آمیزی توسط اتیدیوم بروماید باندهای جدا شده قابل رؤیت و از آن‌ها عکس گرفته شد. جهت تأیید نتایج مولکولی، تعداد شش ایزوله لیشمانیا نیز هر کدام به طور جداگانه به دو موش بالب/سی تلقیح شدند. ***یافته‌ها:*** در این مطالعه ۰/۵٪ افراد به سالک حاد مبتلا بودند. بیشترین میزان آلودگی زخم حاد (۲٪) در بین افراد ۱۰-۰ سال و کمترین میزان آلودگی (۰٪) در سنین بالای پنجاه سال بود. ۶۲/۹٪ افراد دارای جای زخم بودند و بیشترین میزان جای زخم در گروه سنی ۲۰-۱۱ سال دیده شد. ***نتیجه‌گیری:*** نمونه‌های جدا شده از بیماران مبتلا به سالک در روستاهای مرزی شهرستان گنبدکاووس پس از انجام ITS-PCR و مقایسه پروفایل ژنومیک آن‌ها با نمونه‌های استاندارد لیشمانیا ماژور، لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا اینفانتوم، همگی لیشمانیا ماژور تشخیص داده شد و با ایجاد زخم در تمام موش‌ها پس از گذشت پنج ماه، این نتایج تأیید گردید.

کلمات کلیدی: گنبدکاووس، لیشمانیا ماژور، گلستان، لیشمانیوز جلدی، ITS-PCR.

مقدمه

لیشمانیوز جلدی (Cutaneous lieshmaniasis) عفونت ناشی از تک یاخته‌ای از جنس لیشمانیا است که به وسیله انواعی از پشه‌خاکی فلبوتومینه ماده منتقل می‌شود. این بیماری به سه فرم جلدی (سالک)، احشایی (کالاآزار) و جلدی- مخاطی (اسپوندیا) تظاهر می‌یابد. شایع‌ترین فرم لیشمانیوز نوع جلدی آن است که به دو صورت خشک (شهری) و مرطوب (روستایی) مشاهده می‌شود. سالیانه ۱/۵ میلیون نفر در دنیا به لیشمانیازیس پوستی دچار می‌شوند و تخمین زده می‌شود که حدود ۱۲ میلیون مورد لیشمانیاز جلدی در نقاط مختلف جهان وجود داشته باشد. در ایران سالانه حدود ۱۵ هزار نفر به سالک مبتلا می‌شوند که بر اساس تحقیقات موجود میزان واقعی آن چهار تا پنج برابر میزانی است که گزارش شده است. میزان بروز بیماری در ایران ۲۸ مورد در هر هزار نفر جمعیت تخمین زده می‌شود که بیش‌ترین موارد آن از استان‌های اصفهان و شیراز با ۱/۶۶ مورد در هر هزار نفر جمعیت و کمترین موارد از استان مازندران با ۰/۲۲ مورد در هر هزار نفر جمعیت گزارش شده است.[۱و۲] شهرستان گنبدکاووس از جمله کانون‌های آلودگی در ایران است. این شهرستان در شمال شرقی کشور در استان گلستان واقع شده و اکثر آلودگی‌ها در این شهرستان به علت رفت و آمد مردم به روستاهای هم مرز با کشور ترکمنستان صورت می‌پذیرد. به علت موقعیت جغرافیایی این روستاها و هم‌جواری مناطق مسکونی با لانه‌های متعدد جوندگان و نیز نوع مصالحی که در ساخت خانه‌ها و طویله‌ها و مرغداری‌ها به کار برده

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-05]

شده (نیمه گِلی و شکاف‌دار) این ناحیه محل مناسبی برای تکثیر پشه خاکی می‌باشد. نزدیکی انسان با دام نیز میزان ابتلا به سالک را افزایش داده است. بر اساس آمار ثبت شده در مرکز بهداشت شهرستان گنبدکاووس، سال ۱۳۸۳ تعداد بیماران مبتلا به لیشمانیازیس پوستی۱۷۲ نفر بودند که ۲۷ نفر آن‌ها از مراجعین شهری و ۱۴۵ مورد از مراجعین روستایی بودند که اکثر مراجعین شهری و ساکنین روستایی در اثر رفت و آمد به روستاهای مرزی شهرستان گنبدکاووس مبتلا شده بودند با توجه به وضعیت بیماری در مناطق مرزی این شهرستان پژوهشی لازم بود تا بتوان برای کنترل آن برنامه‌ریزی کرد و چون تاکنون مطالعه‌ای در مورد میزان شیوع بیماری و نوع انگل در این مناطق انجام نشده بود، لذا بر آن شدیم تا تحقیق کاملی را در این زمینه به انجام رسانیم.

روش بررسی

این مطالعهٔ توصیفی از مهر ماه ۱۳۸۵ تا شهریور سال ۱۳۸۶ به طول انجامید. از بین روستاهای مرزی شهرستان گنبدکاووس که هم مرز با کشور ترکمنستان هستند به طور تصادفی پنج روستا انتخاب شدند (هوتن، خیر خوجه، کلیجه، اوخی‌تپه و کرند). از همه اهالی روستاها، خانه به خانه، از نظر وجود زخم سالک، معاینه به عمل آمد و پرسشنامه‌ای شامل اطلاعات مربوط به نام/ نام‌خانوادگی، سن بیمار، جنس بیمار، وجود یا عدم وجود جای زخم و یا زخم حاد، سال ابتلا، محل ابتلا، تعداد زخم‌ها، محل زخم‌ها، و شکل زخم (خشک یا مرطوب)، پرگردید. برای مقایسه میزان ابتلا به بیماری در بین جنس و گروه‌های سنی مختلف از آزمون χ^2 استفاده شد. در این بررسی ۶۹۹۰ نفر از مردم منطقه مورد ارزیابی قرار گرفتند و افراد مبتلا به زخم فعال شناسایی شدند. پس از مراجعهٔ این افراد به آزمایشگاه و اخذ رضایت‌نامه، از زخم آن‌ها نمونه‌برداری شد و با رنگ‌آمیزی گیمسا و مشاهده جسم لیشمن با درشت‌نمایی صد برابر، از زخم مورد بررسی کشت بر روی محیط‌های اختصاصی شامل: محیط اسلوپی اوانس، محیط کشت اشنایدر حاوی ۱۰٪ Foetal bovine serum، N.N.N+ Saline (Novy. McNeal. Nicolle) در شرایط استریل صورت گرفت و در انکوباتور در حرارت $^{\circ}C$ ۲۲–۲۵ نگهداری شدند. محیط‌های کشت برای دیدن پروماستیگوت‌ها دو بار در هفته به مدت شش هفته بررسی گردید. به منظور تکثیر انبوه، انگل‌ها در محیط کشت مایع RPMI۱۶۴۰ پاساژ داده شدند.[۳] به منظور بررسی مولکولی و آزمایشات PCR تعداد ۴۶ ایزوله مورد مطالعه قرار گرفتند. جهت استخراج DNA با روش فنل–کلروفرم، به رسوب انگل ۵۰۰µl بافر لیز که شامل: ۵mM ،MgC۱۲ ۱۰mM ،Tris-HcL ۱٪ ،SDS ۰/۳۲M ،Surcrose می‌باشد، اضافه شد و تا ۲۴ساعت در داخل بن ماری $^{\circ}C$ ۳۷ نگهداری گردید. سپس هم حجم محلول، ۵۰۰µl، فنل افزوده شد و به مدت پنج دقیقه در دور ۸۰۰۰rpm سانتریفوژ گردید. پس از افزودن ۵۰۰µl کلروفرم به مایع رویی و سانتریفوژ با دور ۸۰۰۰rpm، مایع رویی برداشته شد و ۰/۱ حجم مایع، استات سدیم سه مولار و دو برابر حجم کل اتانول مطلق اضافه گردید و یک ساعت در فریزر $^{\circ}C$ ۲۰– قرار داده شد و ده دقیقه با دور ۱۲۰۰۰rpm سانتریفوژ و سپس ۱۰۰µl الکل ۷۰٪ به رسوب اضافه شد و به مدت دو دقیقه با دور ۱۲۰۰۰rpm سانتریفوژ شد. پس از خارج کردن مایع رویی، نمونه به مدت ۱۰–۵ دقیقه در انکوباتور گذاشته شد و سرانجام به رسوب حاصله ۳۰µl آب مقطر دیونیزه استریل اضافه شد و ۱۰ دقیقه در بن ماری $^{\circ}C$ ۳۷ انکوبه گردید. سپس الکتروفورز DNA استخراجی روی ژل آگارز ۱٪ و تخمین میزان DNA، با استفاده از دستگاه Spectroscopy UV با طول موج ۲۶۰nm انجام گردیده است.[۴] جهت انجام PCR حجم هر واکنش ۳۰µl انتخاب شد. این مخلوط واکنشی شامل: (pH=۸/۳) ۱۰mM Tris-HCL، ۱۰mM of each deoxyribonucleotide و ۲۵mM MgC۱۲ به همراه ۱۰۰pmol از هر پرایمر: LeishF: 5’-CAACACGCCGCCTCCTCTCT-3’، LeishR: 5’-CCTCTCTTTTTTCNCTGTGC-3’ و نیز پنج واحد Taq DNA polymerase بود. برنامهٔ ارایه شده به ترموسایکلر برای انجام ITS-PCR شامل: دناتوراسیون اولیه در $^{\circ}C$ ۹۴ به مدت پنج دقیقه و سپس ۳۰ سیکل دناتوراسیون در $^{\circ}C$ ۹۴ به مدت ۳۰ ثانیه، آنیلینگ در $^{\circ}C$ ۶۲ به مدت ۳۰ ثانیه، اکستنشن در $^{\circ}C$ ۷۲ به مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت Final extension در یک سیکل $^{\circ}C$ ۷۲ به مدت پنج دقیقه بود. جهت مطالعه باندهای محصول PCR، از ژل آگارز ۱/۵٪ استفاده شد و نتایج بعد از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید در دستگاه UV transilluminator مشخص گردید. این روش توالی‌هایی به طول ۴۸۵ و ۵۶۵ و ۶۲۶ جفت باز (bp) را به ترتیب برای گونه‌های لیشمانیا تروپیکا، لیشمانیا اینفانتوم و لیشمانیا ماژور تکثیر نموده و تفکیک این گونه‌ها را بر اساس سایز آن‌ها امکان‌پذیر می‌سازد. جهت تأیید نتایج مولکولی،

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-05]

تعداد ۶ ایزوله لیشمانیا نیز هر کدام بـه طـور جداگانـه بـه دو مـوش بالب/سی تلقیح شد، بدین صورت که پس از کشت انگل‌های لیشمانیا به صورت انبوه در محیط‌های کشت مایع، پـس از گذشـت پـنج روز مقدار ۰/۲-۰/۱ میلی‌لیتر از محیط کشت کـه حـاوی حـداقل ۲×۱۰۶ پروماستیگوت در هر میلی‌لیتر بود به صورت زیرجلدی در قاعـدهٔ دم موش با BALB/c تزریق گردید.

یافته‌ها

این تحقیق در پنج روستای مرزی شهرستان گنبـدکاووس شـامل کرند، هوتن، خیرخوجه، کلیجه و اوخی تپه، از مهر ماه تـا بهمـن مـاه ۱۳۸۵ صورت گرفت. جمعاً ۶۹۹۰ نفر (۳۴۷۴ مرد و ۳۵۱۶ زن) مورد بررسی قرار گرفتند. از این تعداد ۰/۵٪ به سالک حاد مبتلا بودنـد کـه از این عده ۰/۴٪ از گروه مردان و ۰/۶٪ از گروه زنان بودنـد. آزمـون آماری χ^2 نشان داد که بین دو جنس از نظر ابتلا به زخم حـاد ارتبـاط معنی‌داری وجود ندارد (p=۰/۴۱۷). بیشترین درصد آلودگی زخم حاد (۲٪) در بین افراد ۱۰-۰ سال و کمترین درصد آلودگی (۰٪) در سنین بالای پنجاه سال بود. فراوانی محـل ضـایعات جلـدی شـامل: ۴۲/۵٪ زخم روی پا، ۲۹/۸٪ زخم روی دست ۲۳/۴٪ زخـم روی صـورت و ۴/۳٪ زخم روی سایر نقاط بدن بود. از کل مبتلایـان بـه زخـم حـاد، ۲/۹٪ دارای یک زخم، ۱۴/۳٪ دارای دو زخم، ۲۸/۶٪ دارای سه زخم و ۵۴/۲٪ دارای بیش از سه زخم، و تمامی زخـم‌هـا از نـوع مرطـوب بودند. در این بررسی ۴۳۹۵ نفر (۶۲/۹٪) نیز دارای جای زخم بودنـد که از این عده ۲۰۶۹ نفر (۵۹/۶٪) مرد و ۲۳۲۶ (۶۶/۲٪) زن بودند که با توجه به آزمون آماری χ^2 و p<۰/۰۰۱ ارتباط معنی‌داری بین این دو گروه جنسی مشاهده می‌شـود و زنـان بیـشتر در معـرض ابـتلا قـرار داشته‌اند. بیشترین میزان شیوع زخم در سنین ۲۰-۱۱ سـال بـا تعـداد ۱۴۸۹ (۷۵/۷٪) و کمتـرین آن در سـنین ۱۰-۱سـال بـا تعـداد ۴۳۱ (۳۱/۲٪) مشاهده گردید (جدول ۱). بـا توجـه بـه آزمـون χ^2 ارتبـاط معنی‌داری میان داشتن جای زخم با گروه‌های سنی مشاهده می‌گـردد (p<۰/۰۰۱). از کـل مـوارد جـای زخـم، (۳۱/۷٪) مـوارد روی پـا، (۲۱/۹٪) روی دسـت، (۱۵/۷٪) روی صـورت و (۳/۶٪) روی سـایر نقاط بدن بودند (جدول ۲). از کل مبتلایان بـه جـای زخـم، (۴۲/۱٪) دارای یک زخم، (۱۴/۸٪) دارای دو زخم، (۳/۲٪) دارای سه زخـم و (۲/۷٪) دارای بیش از سه زخم بودند (جـدول ۳). در بررسـی شـیوع جای زخم بر اساس محل سـکونت آزمـون χ^2 نـشان داد کـه ارتبـاط معنی‌داری بین این دو وجود دارد (p<۰/۰۰۱). بیشترین درصـد جـای زخم در روستای اوخی تپه (۱۰۰٪) و کمترین درصد جـای زخـم در روستای کرند با (۵۴/۷٪) دیده شد (جدول ۴). از نظر ارتبـاط شـیوع زخم حاد با محل سـکونت آزمـون χ^2 نـشان داد کـه ارتبـاط معنـی-داری بیـن این دو وجود دارد (p<۰/۰۰۱). بیشترین درصد آلودگی در

جدول- ۱: فراوانی زخم حاد و جای زخم سالک در خانوارها بر حسب سن و جنس در روستاهای مرزی شهرستان گنبدکاووس در سال۸۶-۱۳۸۵.

سن (سال)	مرد			زن			مجموع		
	تعداد افراد معاینه شده	افراد دارای جای زخم	افراد دارای زخم حاد	تعداد افراد معاینه شده	افراد دارای جای زخم	افراد دارای زخم حاد	تعداد افراد معاینه شده	افراد دارای جای زخم	افراد دارای زخم حاد
		تعداد (درصد)	تعداد (درصد)		تعداد (درصد)	تعداد (درصد)		تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
۱-۱۰	۶۹۷	۲۳۱(٪۳۳/۱)	۱۴(٪۲)	۶۸۶	۲۰۰(٪۲۹/۲)	۱۴(٪۲)	۱۳۸۳	۴۳۱(٪۳۱/۲)	۲۸(٪۲)
۱۱-۲۰	۱۰۱۶	۷۳۳(٪۷۲/۱)	۰(٪۰)	۹۵۰	۷۵۶(٪۷۹/۶)	۲(٪۰/۲)	۱۹۶۶	۱۴۸۹(٪۷۵/۷)	۲(٪۰/۱)
۲۱-۳۰	۷۰۴	۴۸۸(٪۶۹/۳)	۱(٪۰/۱)	۶۸۰	۵۰۱(٪۷۳/۷)	۱(٪۰/۱)	۱۳۸۴	۹۸۹(٪۷۱/۵)	۲(٪۰/۱)
۳۱-۴۰	۴۲۶	۲۷۸(٪۶۵/۳)	۰(٪۰)	۵۱۴	۳۸۶(٪۷۵/۱)	۲(٪۰/۴)	۹۴۰	۶۶۴(٪۷۰/۶)	۲(٪۰/۲)
۴۱-۵۰	۳۱۱	۱۶۸(٪۵۴)	۰(٪۰)	۳۴۹	۲۵۹(٪۷۴/۲)	۱(٪۰/۳)	۶۶۰	۴۲۷(٪۶۴/۷)	۱(٪۰/۲)
۵۱-۶۰	۱۹۱	۱۱۳(٪۵۹/۲)	۰(٪۰)	۱۹۰	۱۴۱(٪۷۴/۲)	۰(٪۰)	۳۸۱	۲۵۴(٪۶۶/۷)	۰(٪۰)
۶۱-۷۰	۷۵	۳۴(٪۴۵/۳)	۰(٪۰)	۹۴	۵۶(٪۵۹/۶)	۰(٪۰)	۱۶۹	۹۰(٪۵۳/۳)	۰(٪۰)
۷۰+	۵۴	۲۴(٪۴۴/۴)	۰(٪۰)	۵۳	۲۷(٪۵۰/۹)	۰(٪۰)	۱۰۷	۵۱(٪۴۷/۷)	۰(٪۰)
مجموع	۳۴۷۴	۲۰۶۹(٪۵۹/۶)	۱۵(٪۰/۴)	۳۵۱۶	۲۳۲۶(٪۶۶/۲)	۲۰(٪۰/۶)	۶۹۹۰	۴۳۹۵(٪۶۲/۹)	۳۵(٪۰/۵)

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-05]

جدول- ۲: فراوانی زخم سالک در قسمت‌های مختلف بدن مبتلایان به لیشمانیوز جلدی در روستاهای مرزی شهرستان گنبدکاووس در سال ۸۶-۱۳۸۵

محل زخم	وضعیت زخم	
	دارد	ندارد
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
پا	۲۲۱۸(٪۳۱/۷)	۴۷۷۲(٪۶۸/۳)
صورت	۱۰۹۶(٪۱۵/۷)	۵۸۹۴(٪۸۴/۳)
دست	۱۵۳۳(٪۲۱/۹)	۵۴۵۷(٪۷۸/۱)
سایر نقاط بدن	۲۵۰(٪۳/۶)	۶۷۴۰(٪۹۶/۴)

لازم به ذکر است که برخی افراد مورد بررسی در چند محل بدن زخم داشته‌اند

جدول- ۳: توزیع تعداد موارد زخم سالک در روستاهای مرزی شهرستان گنبدکاووس در سال ۸۶-۱۳۸۵

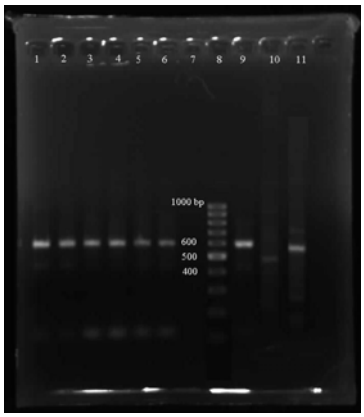
تعداد زخم	تعداد (درصد)
ندارد	۲۵۹۸(٪۳۷/۲)
یک زخم	۲۹۴۶(٪۴۲/۱)
دو زخم	۱۰۳۵(٪۱۴/۸)
سه زخم	۲۲۵(٪۳/۲)
بیشتر از سه زخم	۱۸۶(٪۲/۷)
مجموع	۶۹۹۰(٪۱۰۰)

جدول- ۴: جدول فراوانی‌های زخم سالک برحسب روستاهای تحت مطالعه شهرستان گنبدکاووس در سال ۸۶-۱۳۸۵

روستاها	جای زخم		مجموع
	دارد	ندارد	
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
هوتن	۱۵۲۷(٪۷۳/۳)	۵۵۶(٪۲۶/۷)	۲۰۸۳(٪۲۹/۸)
خیرخوجه	۲۹۹(٪۶۹/۹)	۱۲۹(٪۳۰/۱)	۴۲۸(٪۶/۱)
کلیجه	۳۲۶(٪۶۸/۳)	۱۵۱(٪۳۱/۷)	۴۷۷(٪۶/۸)
اوخی تپه	۱۱۸(٪۱۰۰)	۰(٪۰)	۱۱۸(٪۱/۷)
کرند	۲۱۲۵(٪۵۴/۷)	۱۷۵۹(٪۴۵/۳)	۳۸۸۴(٪۵۵/۶)
مجموع	۴۳۹۵(٪۶۲/۹)	۲۵۹۵(٪۳۷/۱)	۶۹۹۰(٪۱۰۰)

جدول- ۵: جدول فراوانی زخم حاد برحسب روستاهای تحت مطالعه شهرستان گنبدکاووس در سال ۸۶-۱۳۸۵

روستاها	جای زخم		مجموع
	دارد	ندارد	
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
هوتن	۱۹(٪۰/۹)	۲۰۶۴(٪۹۹/۱)	۲۰۸۳(٪۲۹/۸)
خیرخوجه	۵(٪۱/۲)	۴۲۳(٪۹۸/۸)	۴۲۸(٪۶/۱)
کلیجه	۳(٪۰/۶)	۴۷۴(٪۹۹/۴)	۴۷۷(٪۶/۸)
اوخی تپه	۱(٪۰/۸)	۱۱۷(٪۹۹/۲)	۱۱۸(٪۱/۷)
کرند	۷(٪۰/۲)	۳۸۷۷(٪۹۹/۸)	۳۸۸۴(٪۵۵/۶)
مجموع	۳۵(٪۰/۵)	۶۹۵۵(٪۹۹/۵)	۶۹۹۰(٪۱۰۰)



شکل- ۱: تکثیر نواحی ITS1 و ITS2 در DNA ریبوزومال با پرایمرهای LeishF و LeishR. لاین‌های یک تا شش در نمونه‌های شش بیمار (لیشمانیا ماژور)، لاین هفت کنترل منفی، لاین هشت مارکر DNA ۱۰۰bp و ۳ لاین ۹، ۱۰ و ۱۱ به ترتیب لیشمانیا ماژور، لیشمانیا ترویپکا و لیشمانیا اینفانتوم استاندارد می‌باشند.

روستای خیرخوجه با (٪۱/۲) و کمترین درصد آلودگی در روستای کرند با (٪۰/۲) مشاهده شد (جدول ۵). در ضمن تمام مراجعین که از نظر زخم سالک مثبت بودند و در گسترش لام آن‌ها جسم لیشمن دیده شد، دارای زخم عفونی و باکتریایی بودند و بیشتر مراجعین به آزمایشگاه برای بررسی زخم از نظر سالک در ماه‌های آبان و آذر ثبت گردید. در این تحقیق تعداد ۴۶ ایزوله با روش مولکولی و آزمایشات PCR مورد بررسی قرار گرفتند. با استفاده از تنوع ژن‌های ناحیه Non coding transcribed مربوط به DNA ریبوزومال در گونه‌های مختلف لیشمانیا پرایمرها طراحی شدند و جهت تکثیر قطعات ITS1، ITS2 از روش ITS-PCR جهت غربال‌گری و تعیین گونه لیشمانیاهای جدا شده از ضایعات جلدی مورد استفاده قرار گرفتند. با این روش، گونه‌های لیشمانیا ترویپکا با ایجاد یک یا حداکثر دو باند کوچک‌تر از ۵۰۰bp (۴۰۰-۴۵۰bp)، گونه لیشمانیا ماژور با ایجاد یک باند بزرگ‌تر

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-05]

از ۶۰۰bp (۷۰۰bp–۶۰۰) و گونه لیشمانیا اینفانتوم با ایجاد دو باند اختصاصی بزرگ‌تر از ۵۰۰bp (۵۰۰bp و ۷۰۰bp) از یکدیگر قابل تفکیک هستند. شکل ۱ باندهای اختصاصی ایجاد شده توسط شش نمونه به دست آمده از بیماران همراه با گونه‌های استاندارد لیشمانیا ماژور، لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا اینفانتوم را در کنار مارکر ۱۰۰bp نشان می‌دهد. به منظور تایید روش‌های مولکولی تعداد شش ایزوله لیشمانیا نیز هر کدام به طور جداگانه به دو موش BALB/c تلقیح و پس از پنج ماه هر ۱۲ موش در قاعده دم دچار زخم سالک شدند.

بحث

لیشمانیوز جلدی در اکثر شهرهای ایران به طور اندمیک دیده می‌شود.[۵] شهرستان گنبدکاووس از جمله کانون‌های آلوده قدیمی در ایران است. این شهرستان در بخش شرقی استان گلستان واقع شده است. در این مطالعه روستاهای مرزی شهرستان گنبدکاووس (کرند، هوتن، خیرخوجه، کلیجه، اوخی‌تپه) در طی ماه‌های مهر تا بهمن ۱۳۸۵ بر اساس مشاهده خانه به خانه از نظر وجود لیشمانیوز جلدی مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور تعیین گونهٔ غالب عامل لیشمانیوز جلدی در بیماران، جداسازی انگل لیشمانیا از زخم بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی انجام شد و جهت تعیین گونه از روش ITS-PCR استفاده گردید. شهبازی در تحقیقی روش ITS-PCR را با روش‌های پارازیتولوژیکی در تشخیص لیشمانیاها مقایسه کرد و نشان داد که حساسیت روش ITS-PCR با ۹۸/۸٪، بیشتر از حساسیت روش‌های تشخیص میکروسکوپی و کشت لیشمانیا به ترتیب ۷۹/۳٪ و ۸۶/۲٪ می‌باشد. آن‌ها همچنین با استفاده از روش ITS-PCR عوامل لیشمانیوز جلدی در شهر مشهد را بررسی کردند و لیشمانیا تروپیکا را به عنوان گونهٔ غالب عامل بیماری (۹۶/۵٪) در این ناحیه معرفی نمودند.[۶] Bensossuan نیز با روش ITS-PCR ۷۴/۶٪ نمونهٔ مثبت لیشمانیازیس را در اسراییل شناسایی کرد که شامل ۵۰/۹٪ لیشمانیا ماژور و ۴۷/۲٪ لیشمانیا تروپیکا و ۱/۹٪ لیشمانیا برازیلینسیس بود.[۷] Cupolillo از روش ITS-PCR جهت طبقه‌بندی گونه‌های لیشمانیای دنیای جدید برای مطالعات اپیدمیولوژیک استفاده کرد.[۸] Al-Jawabreh نیز در فلسطین برای شناسایی گونه‌های لیشمانیا از ITS-PCR استفاده نمود و از میان ایزوله‌ها، ۵۷٪ لیشمانیا ماژور و ۴۳٪ لیشمانیا تروپیکا بودند.[۹] در مطالعهٔ ما که تعداد ۶۹۹۰ نفر ساکنین روستاهای مرزی مورد بررسی قرار گرفتند، میزان شیوع جای زخم ۶۲/۹٪ و زخم حاد ۰/۵٪ تعیین گردید. بیشترین درصد آلودگی زخم حاد در بین افراد ۱۰-۰ سال و کمترین درصد آلودگی در سنین بالای پنجاه سال بود و بیشترین درصد جای زخم در سنین ۲۰-۱۱ سال و کمترین آن در گروه سنی ۱۰-۱ سالگی بود. نتایج این بررسی با تحقیق آقاتابای که در روستاهای مرزی شهرستان گنبدکاووس در سال ۱۳۷۴ بر روی ۹۸۹ نفر دانش‌آموز انجام شده بود و میزان شیوع را ۶۵/۵٪ و موارد زخم حاد را ۰/۵٪ به دست آورده بود کاملا هماهنگی داشت.[۱۰] با توجه به نتایج این بررسی و همچنین مطالعات انجام شده در گذشته، منطقهٔ گنبدکاووس یکی از کانون‌های مهم اندمیک بیماری لیشمانیوز جلدی نوع Zoonotic به شمار می‌رود. اکثر موارد زخم حاد را در این منطقه افراد گروه‌های سنی زیر ده سال و افراد مهاجر که شامل کارگران، معلمان و سربازان، تشکیل می‌دهند. جای زخم نیز بیشتر در سنین بالا مشاهده می‌شود. به دلیل مصونیت نسبی، ابتلا به بیماری در بزرگسالان کمتر قابل مشاهده است. در این مطالعه آلوده‌ترین روستا در میان پنج روستا از نظر جای زخم، اوخی‌تپه با ۱۰۰٪ شیوع جای زخم و روستای خیرخوجه با میزان بروز ۱/۲٪ از نظر موارد زخم حاد بودند. قابل ذکر است که یکی از علل فراوانی موارد زخم حاد در روستای خیرخوجه ابتلا مهندسین و کارگران شرکت آب و فاضلاب به این بیماری بود. این افراد از شهر ساری به این روستا آمده بودند. این امر باعث افزایش تعداد مبتلایان در این روستا شده بود. علت دیگر شیوع بالای موارد زخم حاد در خیرخوجه، بافت کاملاً روستایی و کمبود امکانات بهداشتی در این روستا نسبت به سایر روستاها بود. تمامی افراد مبتلا به سالک حاد در این منطقه از نظر طول دوره زخم و شکل زخم بررسی شدند. دورهٔ ابتلا به زخم چهار تا پنج ماه و زخم‌ها از نوع مرطوب و اکثراً آلودگی ثانویه باکتریایی و قارچی داشتند و شبیه زخم‌های Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis (ZCL) بودند. در این مطالعه محل ضایعات جلدی مشابه کانون‌های ZCL در پا، دست و صورت بیش از سایر نقاط بدن بود. همچنین مانند سایر کانون‌های ZCL، روند انتشار بیماری بیشتر در فصل پاییز و ماه‌های آبان و آذر دیده شد. نظری[۱۱] نیز روستاهای مینودشت استان گلستان را کانون ZCL معرفی کرده و در آن منطقه بیشترین موارد مراجعین بیمار در فصل پاییز و آذر ماه بوده است. تعداد ۴۶ ایزوله که از بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی ساکن روستاهای مرزی جدا گردیده

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-05]

بود، با استفاده از تنوع ژن‌های ناحیه Non coding transcribed مربوط به rDNA با روش ITS-PCR تعیین گونه شدند و گونه غالب لیشمانیا ماژور بود که این نتایج به خوبی کانون ZCL بودن این منطقه را تایید می‌کند. در بررسی انجام شده توسط نظری نیز در منطقه مینودشت استان گلستان که با استفاده از روش‌های مولکولی انجام شد، گونه غالب لیشمانیا ماژور اعلام گردید.[۱۱] جهت تأیید نتایج مولکولی تعداد شش ایزوله لیشمانیا نیز به موش‌های بالب/ سی تلقیح و در همهٔ آن‌ها زخم ایجاد شد.

References

۱. صایبی اسماعیل. در کتاب بیماری‌های انگلی در ایران. چاپ چهارم. تهران: انتشارات آییژ، صفحه ۱۸۵.

۲. محب علی مهدی. در کتاب بیماری‌های تک‌یاخته‌ای مشترک بین انسان و حیوانات. چاپ اول. تهران: صفحات ۶۲ تا ۶۵.

3. Evans D, editor. Handbook on Isolation, Characterization and Cryopreservation of Leishmania. Geneva: World Health Organization, 1989.
4. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, editors. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
5. Nadim A. Leishmaniasis. In: Azizi F, Janghorbani M, Hatam H, editors. Epidemiology and Control of Common Disorders in Iran. 2nd ed. Shahid Beheshti University of Medical Sciences: Endocrine and Metabolism Research Center; 2000. p. 524-34.
6. Shahbazi F, Shahabi S, Kazemi B, Mohebali M, Abadi AR, Zare Z. Evaluation of PCR assay in diagnosis and identification of cutaneous leishmaniasis: a comparison with the parasitological methods. *Parasitol Res* 2008;103(5):1159-62.
7. 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.
8. Cupolillo E. 1998. Genetic relationships and evolution of new world leishmaniasis: suggestion of evolution link with Endotrypanum. Mem .Inst. Oswaldo. cruz. 93, P.186.
9. Al-Jawabreh A, Schnur LF, Nasereddin A, Schwenkenbecher JM, Abdeen Z, Barghuthy F, et al. The recent emergence of Leishmania tropica in Jericho (A'riha) and its environs, a classical focus of L. major. *Trop Med Int Health* 2004;9(7):812-6.

۱۰. آقاتابای محمد دردی. بررسی تغییرات فصلی میزان آلودگی ناقلین لیشمانیوز با پروماستیگوت در کانون ترکمن صحرا. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، ۱۳۷۵.

۱۱. نظری فضل اله. بررسی میزان شیوع لیشمانیوز جلدی (عفونت انسانی) و تعیین مخازن حیوانی آن در شهرستان مینودشت از استان گلستان. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، ۱۳۷۸.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-05]

Tehran University Medical Journal; Vol. 68, No. 4, July 2010: 250-256

Identification of Leishmania species isolated from human cutaneous Leishmaniasis in Gonbad-e-Qabus city using a PCR method during 2006-2007

Fatemeh Mesgarian MSc.[1]
Nourina Rahbarian SPH[*2,3]
Mahnaz Mahmoudi Rad PhD.[4]
Homa Hajaran PhD.[5]
Farideh Shahbaz PhD.[3]
Zahra Mesgarian AdvDip.[1]
Niloofar Taghipour MSc.[3]

1- Gonbad-e Qabus Health Center, Golestan University of Medical Sciences, Golestan, Iran.

2- Cellular and Molecular Biology Research Center.
3- Department of Medical Parasitology and Mycology, Medicine Faculty
4- Skin Research Center.

Shahid Behesthi University, M.C., Tehran, Iran.

5- Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

*Corresponding author: Cellular and Molecular Biology Research Center, Shahid Behesthi University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Tel: +98-21-23872563
email: nrahbarian@yahoo.com

Received: April 21, 2010 Accepted: Jun 19, 2010

Abstract

***Background*:** Cutaneous Leishmaniasis is endemic in plenty of Iranian provinces. This study aimed to determine the epidemiological status of the cutaneous Leishmaniasis outbreak, isolation and identification of the parasite using a PCR method in burden rural areas of Gonbad-e-Qabus County, north Iran.

***Methods*:** Data was collected on the prevalence of scars and ulcers over a period of three months among 6990 inhabitants of five villages around Gonbad-e-Qabus county, north Iran, during 2006-2007. Cultured promastigotes were identified using PCR technique. ITS1 and ITS2 of Non Coding Transcribed region at ribosomal DNA of 46 Leishmania isolates were amplified and the PCR products were separated by electrophoresis in 1.5% agarose gel (200 mA, 140 V), visualized by staining with ethidium bromide, and photographed. To confirm the PCR findings, six Leishmanis isolates were injected individually into two BALB/c mice.

***Results*:** Among 6990 inhabitants of the five villages, 62.9% had scars and 0.5% had active lesions. The most highly infected age group was 0-10 years and nobody was infected in individuals more than fifty years of age. Individuals 11 to 20 years of age were the most highly infected age group. The results showed that from 46 isolates, all (100%) were L. major in comparison to reference strains and all of them could produce ulcer at the base tail of BALB/c mice, 4-12 weeks after inoculation.

Conclusions: According to this study, cutaneous Leishmaniasis due to Leishmania major is endemic in Gonbad-e-Qabus county, north Iran. The results were confirmed by active lesions induced in BALB/c mice.

Keywords: Gonbad-e-Qabus, golestan, Leishmania major, cutaneous Leishmaniasis, PCR.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-05]