ORIGINAL ARTICLE

Detection and Identification of Causative Agent of Cutaneous Leishmaniasis Using Specific PCR

Abdol Sattar Pagheh[1],
Mahdi Fakhar[2],
Fateme Mesgarian[3],
Shirzad Gholami[2],
Farhad Badiee[3]

[1] Department of Parasitology and Mycology, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Department of Parasitology and Mycology, Molecular and Cellular Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

(Received July 9, 2011 ; Accepted January 17, 2012)

Abstract

Background and purpose: Golestan Province is one of the endemic foci of cutaneous leishmaniasis (CL). This study aimed at assessing specific-PCR on Giemsa's stained slides for diagnosis of CL as well as detecting the species of *Leishmania* parasite in the patients referring to health center laboratory of Gonbad-e-Qabus.

Materials and methods: This cross-sectional study was carried out in 2010. To diagnose the disease, direct smear (DS) from skin lesions were obtained and stained with Giemsa. If DS was negative, specific PCR on kinetoplast DNA (kDNA) extracted from direct smear would be used to identify the genus and species of *Leishmania* parasite. The data were analyzed using SPSS software.

Results: Direct smear examination showed that out of 303 suspected patients, 238 (78.5%) were infected by CL. Furthermore, the PCR result was positive in 34 (52.3%) out of 65 smears which direct examination did not reveal *Leishmania* amastigotes. Using species-specific primers, *Leishmania* species isolated from all patients were *Leishmania major*.

Conclusion: In most cases the DS is reported negative and it has a low sensitivity in contrast to PCR; therefore, it is suggested that PCR method be used in suspected patients particularly in endemic regions because of its accurate diagnosis.

Key words: Cutaneous leishmaniasis, specific -PCR, kDNA, *Leishmania* major

J Mazand Univ Med Sci 2012; 22(Supple 1): 85-92 (Persian).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-01]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و یکم ویژه نامه ۱ اسفند سال ۱۳۹۰ (۹۲-۸۵)

شناسایی و تعیین گونه عامل لیشمانیوز پوستی با استفاده از روش PCR اختصاصی

عبدالستار پقه[۱]
مهدی فخار[۲]
فاطمه مسگریان[۳]
شیرزاد غلامی[۲]
فرهاد بدیعی[۳]

چکیده

سابقه و هدف: استان گلستان یکی از کانون‌های آندمیک لیشمانیوز پوستی محسوب می‌شود. هدف از این مطالعه ارزیابی روش PCR (واکنش زنجیره ای پلیمراز) اختصاصی بر روی اسلایدهای رنگ‌آمیزی شده بیماران به منظور تشخیص بیماری و شناسایی گونه‌های مختلف انگل لیشمانیا در بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه مرکز بهداشت شهرستان گنبد کاووس بود.

مواد و روش ها: این مطالعه مقطعی در سال ۱۳۸۹ صورت گرفت. تشخیص بیماری با تهیه اسمیر مستقیم از ضایعات پوستی و رنگ‌آمیزی گیمسا بود و در صورت منفی شدن آن، از روش PCR اختصاصی بر روی DNA کینتوپلاست (kDNA) استخراج شده از اسمیرهای مستقیم به منظور تعیین جنس و گونه انگل *لیشمانیا* استفاده شد. اطلاعات به‌دست آمده ثبت و توسط نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

یافته ها: در این مطالعه۳۰۳ بیمار مشکوک به لیشمانیوز پوستی مورد بررسی قرار گرفتند که نتیجه آزمایش مستقیم ۲۳۸ نفر (۷۸/۵ درصد) مثبت شد. همچنین با انجام روش PCR، بر روی ۶۵ گسترش مستقیم فاقد جسم لیشمن، در تعداد ۳۴ مورد (۵۲/۳ درصد)، DNA کینتوپلاست انگل *لیشمانیا* شناسایی شد. همچنین با استفاده از پرایمرهای اختصاصی گونه، انگل لیشمانیا در تمامی بیماران *لیشمانیا ماژور* بود.

استنتاج: از آن‌جایی‌که در بسیاری از موارد اسمیر مستقیم، منفی گزارش می‌شود و این روش از حساسیت پایینی برخوردار است و از سوی دیگر PCR دارای حساسیت بالایی است، لذا پیشنهاد می‌شود در صورت مشکوک بودن به بیماری به‌ویژه در مناطق آندمیک، به منظور تشخیص دقیق‌تر و یا رد آن، لزوماً از روش PCR استفاده گردد.

واژه‌های کلیدی: لیشمانیوز پوستی، PCR اختصاصی، kDNA ، لیشمانیا ماژور

مقدمه

بیماری لیشمانیوز توسط گونه‌های مختلف تک یاخته‌ای از جنس لیشمانیا ایجاد می‌شود. ناقل آن پشه‌های خاکی ماده از جنس فلبوتوموس است(۱).

بیماری لیشمانیوز پوستی در ۸۲ کشور جهان آندمیک است و حدود ۹۰ درصد موارد آن از کشورهای افغانستان، پاکستان، عربستان، ترکیه، ایران، سوریه، الجزایر،

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۲۴- ۸۹ است که توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تامین شده است.

مولف مسئول: مهدی فخار- ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزر آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی E-mail: mahdif53@yahoo.com
۱. دانشجوی انگل شناسی و قارچ شناسی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۲. گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۳. دانشگاه علوم پزشکی گلستان

تاریخ دریافت : ۹۰/۴/۱۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۹۰/۹/۲۹ تاریخ تصویب : ۹۰/۱۰/۲۷

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-01]

برزیل و پرو گزارش می‌شود. در حال حاضر ۱۲ میلیون نفر در دنیا از این بیماری رنج می‌برند. میزان بروز سالیانه بیماری در دنیا ۱/۵-۱ میلیون تخمین زده می‌شود(۲) 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 نفرجمعیت گزارش شده است. میزان بروز در ایران در سال ۱۳۸۶، ۳۷ درصد هزار بوده است(۳). بیماری سالک در بیش از نیمی از استان‌های کشور به‌صورت بومی وجود دارد که در یازده استان شامل گلستان، اصفهان، سمنان، یزد، کرمان، فارس، بوشهر، هرمزگان، خوزستان ،ایلام و سیستان و بلوچستان شیوع بالایی دارد(۳). در ایران سالانه حدود ۲۰ هزار نفربه سالک مبتلا می‌شوند که بر اساس تحقیقات به‌عمل آمده میزان واقعی آن چهار تا پنج برابر میزانی است که گزارش شده است(۳). شهرستان گنبد کاووس از جمله کانون‌های قدیمی بیماری در ایران است که به‌طور میانگین سالانه ۱۶۰ مورد لیشمانیوز جلدی از این شهرستان گزارش شده است(۴).

به طورمعمول تشخیص لیشمانیوز جلدی بر اساس علایم کلینیکی یافت شده در بیماران و تأیید آن از طریق روش‌های پارازسیتولوژی از جمله آزمایش مستقیم ویا کشت می‌باشد که این روش‌ها به‌عنوان معیار طلایی مطرح هستند. اگر چه روش مشاهده مستقیم اسمیر زخم با میکروسکوپ ساده‌ترین روش در شناسایی انگل لیشمانیا می‌باشد اما حساسیت پایین آن در تشخیص موارد دارای تعداد کم انگل نشان‌دهنده ضعف این روش می‌باشد(۷- ۵). روش‌های کشت معمول از حساسیت و ویژگی نسبتاً مناسبی برخوردار هستند اما این روش‌ها نیز محدودیت‌های خاص خود را دارند. از جمله این موارد می‌توان به طولانی بودن زمان انکوباسیون، کاهش معنی‌داری در تشخیص پروماستیگوت‌ها در زخم‌های مزمن نسبت به زخم‌های حاد و نیاز به تعداد زیاد آماستیگوت آسپیره شده از زخم اشاره کرد(۶۸). از سوی دیگر شناسایی گونه لیشمانیا، به دلیل تفاوت گونه‌ها از نظرمیزان حدت و نحوه پاسخ به رژیم‌های درمانی مختلف مهم است چرا که تشخیص صحیح گونه جهت پیشگویی‌های بالینی و تجویز رژیم درمانی مناسب و اختصاصی، ضروری می‌باشد(۶،۵).

امروزه جهت شناسایی گونه‌های انگل لیشمانیا از روش‌های مولکولی مانند انواع PCR استفاده می‌شود. از جمله مزایای روش مولکولی می‌توان به مواردی از جمله نیاز به مقدارکم DNA، عدم تأثیر شرایط مخدوش‌کننده محیط و میزبان و قابلیت بررسی تعداد زیادی نمونه در یک زمان کوتاه و حساسیت بالای تست اشاره نمود(۹،۱۰). به‌طور کلی درمان موثر بستگی به شناخت گونه لیشمانیای عامل بیماری دارد. از سوی دیگر بر اساس پروتکل کشوری درمان سالک و همچنین سازمان بهداشت جهانی، تمام موارد ابتلا به سالک نوع روستایی با عامل لیشمانیا ماژور در صورت وجود زخم در نقاط پوشیده بدن نیاز به درمان ندارند(۳، ۷- ۵). زیرا باعث مصونیت شخص خواهد شد. با توجه به تابلو بالینی بسیار گسترده و پیچیده ضایعات پوستی بیماری و موارد تشخیص افتراقی متعدد و از سوی دیگر چون روش مستقیم تشخیص بیماری، از حساسیت کافی برخوردار نیست و همچنین متفاوت بودن پروتکل درمانی در افراد مبتلا به سالک نوع شهری و روستایی، لذا مطالعه حاضر با هدف، شناخت بیشتر وضعیت دموگرافیک بیماری، شناسایی مولکولی گونه های مختلف و ارزیابی روش مولکولی PCR (واکنش زنجیره‌ای پلیمراز) بر روی اسلایدهای رنگ‌آمیزی شده جهت تشخیص دقیق بیماری در افراد مراجعه‌کننده به مرکز بهداشت شهرستان گنبد کاووس طراحی شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه مقطعی در سال ۱۳۸۹روی بیماران مراجعه‌کننده به مرکز بهداشت شهرستان گنبد کاووس

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-01]

(واقع در بخش شرقی استان گلستان) انجام شد. بیمارانی که لیشمانیوز پوستی در آن‌ها تشخیص داده شد، مورد بررسی اپیدمیولوژی (توزیع سنی، جنسی، زمانی و مکانی، محل زخم و تعداد زخم) قرار گرفتند. تشخیص بیماری با تهیه اسمیر مستقیم از ضایعات و رنگ‌آمیزی به روش گیمسا بود. در این روش برش کوچکی در اطراف زخم ایجاد کرده و از سروزیته این ناحیه گسترش نازکی روی لام میکروسکوپی تهیه شد. لام های تهیه شده به روش گیمسا رنگ‌آمیزی شده و در زیر میکروسکوپ اجسام لیشمن (آماستیگوت‌ها) در داخل و یا خارج ماکروفاژها جستجو شدند. در صورت منفی شدن روش مستقیم، از روش PCR اختصاصی جهت شناسایی جنس *لیشمانیا* استفاده شد.

برای استخراج DNA از اسلایدهای رنگ‌آمیزی شده مربوط به بیماران مبتلا به لیشمانیوز پوستی استفاده شد. برای این منظور از روش High salt با تغییرات جزیی استفاده گردید(۱۱). سپس DNA استخراج شده، جهت آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز اختصاصی جنس و گونه مورد استفاده قرار گرفت. در روش PCR با استفاده از پرایمرهای عمومی (جهت تشخیص جنس *لیشمانیا*) RV1 (5`-CTT TTC TGG TCC CGC GGG TAG G-3`) RV2 (5`-CCA CCT GGC CTA TTT TAC ACC A-3) قطعه ثابت (۱۴۵جفت باز) از حلقه‌های کوچک DNA(minicircles) کینتوپلاست انگل لیشمانیا تکثیر و در یک مرحله روش PCR انجام شد(۱۲). همچنین جهت تعیین گونه انگل با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (5- GGG GTT GGT GTA AAA TAG GG-3) LIN LIN17 (5- TTT GAA CGG GAT TTC TG-3) قطعه متغیر از حلقه‌های کوچک DNA (minicircles) کینتوپلاست انگل لیشمانیا تکثیر و در یک مرحله روش PCR اختصاصی، با انجام تغییراتی در تعداد سیکل‌ها و مواد به کار رفته اصلاح آن بر اساس نمونه‌های بالینی، انجام شد(۱۳). پس از انجام PCR، محصول بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز شده با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی گردید. سپس با توجه به شاخص وزنی و مقایسه باند حاصل از نمونه‌ها با گونه‌های مرجع انگل لیشمانیا، جنس انگل تعیین گردید. جمع‌آوری اطلاعات به‌وسیله فرم پرسشنامه انجام و اطلاعات به‌دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون کای دو مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته ها

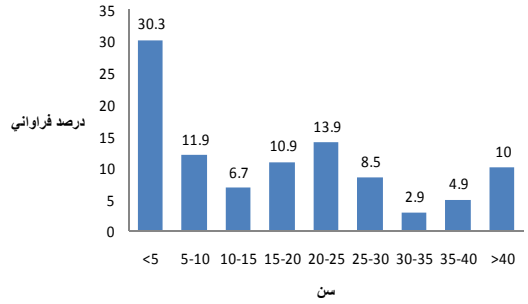
بررسی اپیدمیولوژیک لیشمانیوزپوستی در بیماران مراجعه کننده به مرکز بهداشت شهرستان گنبد کاووس نشان داد که از تعداد ۳۰۳ بیمار مشکوک به این بیماری، گسترش مستقیم ۲۳۸ نفر (۷۸/۵ درصد) از نظر وجود جسم لیشمن در زخم، مثبت بودند. ۱۴۷ نفر (۴۸/۵ درصد) مؤنث و ۱۵۶ نفر (۵۱/۵ درصد) مذکر بودند که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین جنس مؤنث و مذکر مشاهده نشد.

از نظرتعداد ضایعه نیز ۳۴/۶ درصد موارد تنها دارای یک ضایعه، ۲۱/۷ درصد دارای ۲ ضایعه، ۱۲/۶ درصد سه ضایعه و ۳۱/۱ درصد بیشتر از سه ضایعه داشتند. عضو با بیشترین میزان ابتلا دراین بیماران، در رتبه نخست، دست با ۳۶/۹ درصد و بعد از آن به ترتیب پا ۳۰/۶ درصد، اعضای صورت ۲۰/۲ درصد بودکه از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین ابتلا اعضاء مختلف مشاهده نشد. در ۱۲/۳ درصد موارد، زخم نیز بر روی سایر نقاط بدن مشاهده شد. فراوانی بیماری مذکور در گروه‌های مختلف سنی به ترتیب در نمودار شماره ۱ آمده است که بیشترین فراوانی در گروه سنی زیر ۵ سال (۳۰/۳ درصد) و کمترین آن در گروه سنی ۳۵-۳۰ سال (۲/۹ درصد) بود. روند زمانی بیماری بر اساس ماه های سال در استان گلستان نشان می دهد که بطور معنی داری موارد بیماری در فصل پائیز افزایش یافته و بیشترین موارد مربوط به ماه آبان با ۳۱/۷ درصد وکمترین موارد مربوط به ماه اردیبهشت (۰/۴ درصد) بود (p=۰/۰۳۴).

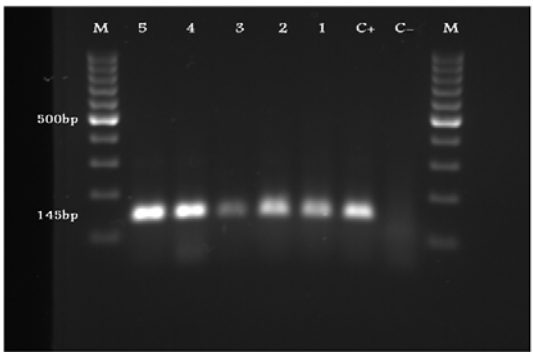
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-01]

از نظر محل سکونت نیز ۱۱/۲ درصد بیماران ساکن شهر گنبد کاووس و ۸۸/۸ درصد ساکنان روستاهای حومه، سربازان و کارگران در نوار مرزی بودند.

همچنین در این مطالعه بر روی ۶۵ نفر از بیماران مراجعه کننده که روش مستقیم آن‌ها منفی بود، از روش PCR (واکنش زنجیره‌ای پلیمراز) با استفاده از پرایمرهای عمومی و اختصاصی به ترتیب جهت شناسایی جنس و گونه انگل *لیشمانیا* انجام گرفت که در تعداد ۳۴ مورد (۵۲/۳ درصد) از آن‌ها DNA کینتوپلاست انگل *لیشمانیا* شناسایی شد (تصویر شماره ۱). همچنین گونه انگل در مقایسه با گونه‌های مرجع در تمام نمونه‌های مورد بررسی *لیشمانیا ماژور* بود (تصویر شماره ۲).



نمودار شماره ۱: فراوانی لیشمانیوز پوستی بر حسب سن در شهرستان گنبد کاووس از استان گلستان، ۱۳۸۹



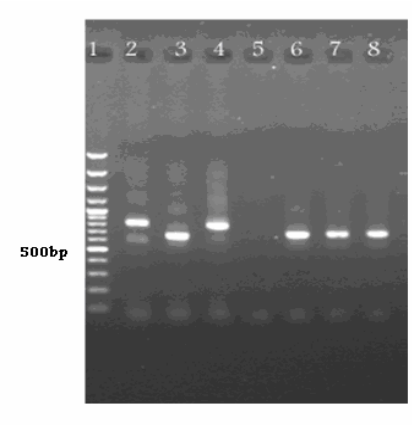
تصویر شماره ۱: نتیجه الکتروفورز محصولات PCR اختصاصی نمونه‌های اسمیر مستقیم با پرایمرهای RV1 و RV2 در ژل آگاروز ۱/۵ درصد

M= مارکر ۱۰۰ bp

C+= L.m استاندارد (MRHO/IR/75/ER) (۱۴۵ bp)

C-= کنترل منفی

شماره‌های ۵-۱= نمونه‌های اسمیر مستقیم بیماران



تصویر شماره ۲: نتیجه الکتروفورز محصولات PCR اختصاصی نمونه‌های اسمیر مستقیم با پرایمرهای LINR4 و LIN17 در ژل آگاروز ۱/۵ درصد

۱- مارکر ۱۰۰ bp ۴- L.i استاندارد

۲- *L.t* استاندارد ۵- کنترل منفی

۳- L.m استاندارد شماره های ۸-۶= نمونه های بیماران

بحث

مطالعه حاضر با هدف شناخت بیشتر وضعیت دموگرافیک بیماری، یافته های بالینی، شناسایی مولکولی گونه‌های مختلف و ارزیابی روش مولکولی PCR بر روی اسلایدهای رنگ‌آمیزی شده جهت تشخیص دقیق بیماری لیشمانیوز جلدی در افراد مراجعه‌کننده به مرکز بهداشت شهرستان گنبد کاووس طراحی شد.

شهرستان گنبد کاووس از جمله کانون‌های قدیمی بیماری در ایران است و اغلب موارد بیماری در این شهرستان به علت رفت و آمد مردم به روستاهای هم مرز با کشور ترکمنستان صورت می‌پذیرد(۱۴). به علت موقعیت جغرافیایی این روستاها و هم جواری مناطق مسکونی با لانه‌های جوندگان و نیز نوع مصالحی که در ساخت خانه‌ها، طویله‌ها و غیره به کار برده شده، این ناحیه محل مناسبی برای تکثیر پشه خاکی می‌باشد.

بر اساس آمار ثبت شده در مرکز بهداشت شهرستان گنبد کاووس، سال ۱۳۸۳ تعداد بیماران مبتلا به لیشمانیوز پوستی ۱۷۲ نفر بودند که ۲۷ نفر (۱۵/۷

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-01]

درصد) از آن‌ها ساکن شهر و ۱۴۵ مورد (۸۴/۳ درصد) ساکن مناطق روستایی بودند(۴). دربررسی ما، ۱۱/۲ درصد ساکن شهر و ۸۸/۸ درصد ساکنان روستا بودند. سالیانه به‌طور میانگین ۱۶۰ مورد از بیماری از این شهرستان گزارش می‌شود(۴). این مطلب حاکی از روند رو به رشد بیماری در استان به‌ویژه شهرستان گنبد بوده که البته این مطلب می‌تواند مربوط به حساسیت بالای روش PCR انجام شده در شناسایی بیماران نیز باشد زیرا در روش مستقیم بسیاری از بیماران تشخیص داده نمی‌شوند و این روش حساسیت کمی دارد و بسیاری از بیماران تشخیص داده نمی‌شوند.

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد بیشترین گروه سنی مبتلا به بیماری در گروه سنی زیر ۵ سال بوده است که این مطلب با مطالعات قبلی انجام شده در یک کانون آندمیک جدید در اطراف شهر شیراز و اصفهان و مطالعه مسگریان و همکاران در استان گلستان مطابقت دارد(۱۶-۱۴). در بررسی مسگریان و همکاران بیشترین موارد ابتلا در گروه سنی زیر ۱۰ سال گزارش شده است و موردی از ابتلا در سنین بالای پنجاه سال دیده نشده است. اگر چه الگوی سنی ابتلا به سالک در کانون‌های مختلف کشور بر اساس میزان آندمیسیته بیماری، گونه انگل و الگوی ژنتیکی میزبان متفاوت است، اما به‌طور کلی افزایش میزان بروز بیماری در سنین پایین حاکی از بالا بودن میزان آندمیسیته بیماری در یک منطقه می‌باشد(۱۸-۱۴). فخار و همکاران در بررسی خود بر روی بیماران مبتلا به سالک در شیراز بیان کردند که موارد بیماری در فصل پاییز به‌طور معناداری افزایش یافته است و بیشترین موارد بیماری مربوط به ماه آبان می‌باشد(۱۹). همچنین در بررسی ما، روند زمانی بیماری بر اساس ماه‌های سال، نشان داد که به‌طور معنی‌داری موارد بیماری در فصل پاییز افزایش یافته، بیشترین موارد مربوط به آبان ماه با ۳۱/۷ درصد وکمترین موارد مربوط به اردیبهشت ماه (۰/۴ درصد) بود. در مطالعه مسگریان و همکاران در استان گلستان نیز بین فصل مراجعه و تعداد موارد بیماری ارتباط معنی‌داری گزارش شده است که بر اساس آن فصل پاییز بیشترین تعداد و فصل بهار کمترین موارد ابتلا را به خود اختصاص داده است(۱۴). ضمنا نتایج ما با مطالعات قبلی انجام شده در سایر کانون‌های آندمیک ایران از جمله کانون‌های مهم شیراز، اصفهان و اردستان مطابقت دارد(۱۹-۱۵). نتایج بررسی ما نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین ابتلا جنس مذکر و مؤنث وجود ندارد که این مطلب با سایر مطالعات انجام گرفته در اغلب نقاط ایران و همچنین استان گلستان مطابقت دارد(۱۹-۱۴).

در مطالعه حاضر دست، با ۳۶/۹ درصد بیشترین عضو مبتلا می‌باشد و به دنبال آن صورت، پا و سایر نقاط بدن قرار دارند. به‌طورکلی ضایعات پوستی سالک معمولاً در نقاط باز بدن و جاهایی که بیشتر در معرض گزش پشه خاکی است به‌وجود می‌آیند. در نوع شهری ضایعات غالباً روی صورت و در نوع روستایی بیشتر روی دست و پا ظاهر می‌شوند(۱، ۱۹-۱۴).

با توجه به نتایج بررسی حاضر و همچنین مطالعات قبلی، منطقه گنبد کاووس یکی از کانون‌های اندمیک بیماری لیشمانیوز نوع روستایی به شمار می‌رود. در این منطقه، اغلب موارد زخم حاد در گروه‌های سنی زیر ده سال و ساکن مناطق روستایی هم مرز با جمهوری ترکمنستان بویژه بخش داشلی برون شهرستان گنبد مشاهده می‌شوند؛ اما به دلیل مصونیت نسبی، ابتلا به اشکال حاد بیماری در بزرگسالان کمتر مشاهده می‌شود و در عوض جای زخم (اسکار) بیشتر در این سنین مشاهده می‌گردد. شواهد اپیدمیولوژیک و مولکولی در استان گلستان نشان می‌دهد گونه غالب انگل، *لیشمانیا ماژور* است.

مسگریان و همکاران در سال ۱۳۸۵ با بررسی میزان شیوع لیشمانیوز جلدی، کشت و تعیین هویت انگل لیشمانیا جدا شده از بیماران مبتلا به سالک با روش PCR در روستاهای مرزی شهرستان گنبد کاووس گزارش کردند که میزان شیوع زخم حاد ۰/۵ درصد

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-01]

است و ارتباط معنی‌دار بین دو جنس از نظر ابتلا وجود ندارد(۱۴). در این مطالعه که بطور تصادفی در ۵ روستا و به‌صورت خانه به خانه انجام شده است با کشت انگل لیشمانیا تنها ۴۶ ایزوله بدست آمده است و سپس انجام ITS-PCR بر روی ایزوله‌های به‌دست آمده، گونه انگل لیشمانیا ماژور تعیین شده است. اما در مطالعه حاضر، کارآیی روش PCR در شناسایی انگل لیشمانیا و مقایسه آن با روش اسمیر مستقیم و همچنین تعیین هویت گونه انگل به‌طور مستقیم بر روی نمونه‌های بالینی بیماران (اسمیرهای مستقیم) بدون استفاده از روش وقت‌گیر و پر هزینه کشت انجام پذیرفته است. علاوه بر آن مطالعه حاضر در سال ۸۹ (۵ سال پس از آخرین مطالعه) انجام شده است.

روش‌های تشخیص لیشمانیوز پوستی عمدتاً مبتنی بر روش‌های انگل‌شناسی و مشاهده مستقیم انگل می‌باشد. در مورد سالک نوع شهری و روستایی روش‌های سرولوژی کارایی چندانی ندارند(۱،۷-۶). تشخیص این بیماری هر چند با فراهم نمودن گسترش از زخم بیمار و رنگ‌آمیزی گیمسا به راحتی امکان‌پذیر است، اما در مواردی که زخم مزمن بوده و شمار انگل اندک باشد، تشخیص را مشکل می‌کند(۹،۲۰،۲۱). علاوه بر آن در تشخیص مستقیم، امکان تعیین گونه انگل وجود ندارد و برای تشخیص گونه، کشت انگل و تولید انبوه آن برای تزریق به حیوان آزمایشگاهی یا استفاده از روش ایزوآنزیم و PCR مورد نیاز است. روش‌های متکی بر DNA در تشخیص بیماری لیشمانیوز و شناسایی گونه‌های آن در سال‌های اخیر رواج فراوان یافته است(۹،۱۰،۲۲-۱۹). مطالعات مختلف نشان می‌دهد که، روش‌های PCR مبتنی بر DNA کینتوپلاست انگل لیشمانیا روش حساسی در تشخیص بیماری به ویژه در موارد مزمن است(۱۹،۲۱،۲۲). در مورد کارآیی روش PCR در مطالعه حاضر مشخص شد در ۵۲/۳ درصد از مواردی که نتیجه آزمایش مستقیم منفی بوده است با روش PCR مثبت شده است. لذا به منظور تشخیص دقیق‌تر بیماری و جلوگیری از تشخیص اشتباهی (منفی کاذب) بهتر است از روش PCR استفاده شود. نتایج این مطالعه با سایر مطالعات انجام گرفته سایر محققین و مطالعات قبلی مؤلفین این مقاله هم‌خوانی دارد (۹،۱۰،۱۹،۲۱،۲۲). فخار و همکاران در بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه گروه انگل شناسی دانشکده پزشکی شیراز با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، بر روی تعداد ۶۲ گسترش مستقیم که جسم لیشمن در آن‌ها یافت نشده بود، در ۳۵ مورد (۵۶/۴ درصد) از آن‌ها DNA انگل را شناسایی نمودند(۱۹).

کرمیان و همکاران در انجام روش PCR اختصاصی جنس با استفاده از پرایمرهای 13A و 13B بر روی اسلاید رنگ‌آمیزی شده بیماران مبتلا به سالک، این روش را در شناسایی موارد غیر تیپیک و مزمن بسیار کارآمدتر از روش مستقیم اعلام نمودند. ضمناً در این مطالعه، ویژگی PCR اختصاصی گونه با استفاده از پرایمرهای LINR4 و LIN17 در شناسایی گونه انگل در موارد غیر تیپیک بیماری ۱۰۰ درصد گزارش شده است(۲۱).

پرایمرهای LINR4 و LIN17 استفاده شده در مطالعه حاضر، از روش Aransay و همکاران اقتباس شده است که البته این محقق روش Semi-nested PCR را که یک روش PCR دو مرحله‌ای است معرفی کرده‌اند(۱۳)؛ اما در این مطالعه، به منظور برطرف نمودن اشکالاتی که در روش‌های PCR دو مرحله‌ای وجود دارد، از قبیل وقت‌گیر بودن، دشواری در اجرا به ویژه در بررسی‌های اپیدمیولوژیک و نیز تشخیص بیماری با استفاده از نمونه‌های بالینی و دارا بودن عوامل مخدوش‌کننده بیشتر (از جمله آلودگی متقاطع)، روش PCR یک مرحله‌ای طراحی شده و مورد بررسی قرار گرفت که علاوه بر قابلیت تعیین گونه انگل و مقرون به صرفه بودن، از سهولت نسبی و حساسیت و ویژگی مناسبی نیز برخوردار می‌باشد. با توجه به تابلوی بالینی بسیار گسترده ضایعات پوستی و موارد تشخیص افتراقی متعدد و از سوی دیگر، چون روش اسمیر مستقیم به علل مختلف، به‌ویژه در

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-01]

موارد پارازیتمی پایین، از حساسیت کافی برخوردار نیست لذا توصیه می‌شود در کانون‌های بومی بیماری در صورت مشکوک بودن به بیماری و منفی‌شدن روش مستقیم، از روش PCR اختصاصی جنس به منظور تشخیص بیماری و علاوه بر آن از PCR اختصاصی گونه بر روی نمونه‌های بالینی تازه و یا اسمیرهای مستقیم رنگ‌آمیزی شده، برای شناسایی گونه انگل به منظور به‌کارگیری روش درمانی مؤثرتر استفاده گردد.

نتایج مطالعه حاضر حاکی از بالا بودن میزان آندمیسته (بومی) بیماری سالک روستایی با عامل لیشمانیا ماژور در شهرستان گنبد می‌باشد. همچنین این نتایج ضرورت انجام روش PCR به‌طور مستقیم بر روی نمونه‌های بالینی بیماران از جمله اسمیر مستقیم را چه در موارد منفی شدن و چه در موارد تعیین گونه تأیید می‌کند.

سپاسگزاری

بدینوسیله از زحمات کلیه‌ی همکاران مرکز بهداشت گنبد و مرکز بهداشت استان گلستان به خاطر همکاری‌های ارزشمندشان قدردانی می‌شود. ضمناً از سرکارخانم مریم پورحاجی باقر به خاطر همکاری صمیمانه و آنالیز داده‌ها تشکر و قدردانی به عمل می‌آید. این مطالعه حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی ۲۴-۸۹ دانشگاه علوم پزشکی مازندران می‌باشد. بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران به‌خاطر تأمین هزینه‌های مالی تشکر می‌نماییم. این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد آقای عبدالستار پقه می‌باشد.

References

1. Ardehali S, Rezaei HR, Nadim A. Leishmania parasite and leishmaniosis. 2nd ed. Tehran: Iran University. Pressl; 1994. p. 3-11 (Persian).
2. World Health Organization (WHO). First WHO report on neglected tropical diseases: "working to overcome the global impact of neglected tropical diseases". Available from: http://www.who.int/ neglected_diseases/ 2010 report/en/ Accessed 12 October 2010.
3. Shirzadi MR, Sharifian J, Zeinali M, Qarahgozloo F, Pourmozaffari J, Doosti S. Successful in zoonosis control programmes. 1st ed. Tehran: Ministry of Health and Medical Education publications. 2009 (Persian).
4. Provincial Health Center of Golestan, CDC records. 2009 (Persian).
5. Berman JD. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 Years. Clin Infect Dis 1997; 24(4): 684-703.
6. Murray HW, Berman JD, Davis CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. Lancet 2005; 366(9496): 1561-1577.
7. Expert Committee: Control of leishmaniasis. Technical Report Series 793. WHO, Geneva Switzerland, 1990. Avaliable from: http:// whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_793.pdf
8. Salman SM, Rubeiz NG, Kibbi AG. Cutaneous leishmaniasis: Clinical features and diagnosis. Clin Dermatol 1999; 17(3): 291-296.
9. Al-Jawabreh A, Schoenian G, Hamarsheh O, Presber W. Clinical diagnosis of cutaneous leishmaniasis: A comparison study between standardized graded direct microscopy and ITS1-PCR of Giemsa-stained smears. Acta Trop 2006; 99(1): 55-61.
10. Marques MJ, Volpini AC, Machado-Coelho GL, Machado-Pinto J, da Costa CA, Mayrink W, et al. Comparison of polymerase chain reaction with other laboratory methods for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis: diagnosis

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-01]

of cutaneous leishmaniasis by polymerase chain reaction. Diagn Microbiol Infect Dis 2006; 54(1): 37-43.

11. Aljanabi SM, Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. Nucleic Acids Res 1997; 25(22): 4692-4693.
12. Lauchaud L, Marchergni-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. Comparision of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. J Clin Microbiol 2002; 40(1): 210-215.
13. Aransay AM, Scoulica E, Tselentis Y. Detection and identification of Leishmania DNA within naturally infected sand flies semi nested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. Appl Environ Microbiol 2002; 66(5): 1933-1938.
14. Mesgarian F, Nourian R, Mahmoudi Rad M, Hajaran H, Shahbaz F, Mesgarian Z, et al. Identification of Leishmania species isolated from human cutaneous Leishmaniasis in Gonbad-e-Qabus city using a PCR method during 2006-2007. Tehran Univ Med J 2010; 68(4): 250-256 (Persian).
15. Razmjoua Sh, Hejazy H, Motazedian MH, Baghaei M, Emamy M, Kalantary M. A new focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Shiraz, Iran. Trans R Soc Trop Med Hyg 2009; 103(7): 727-730.
16. Yaghoobi-Ershadi MR, Javadian E. Zoonotic cutaneous leishmaniasis to the north of Isfahan. Human infection in 1991. Bull Soc Pathol Exot 1995; 88(1): 42-45.
17. Yaghoobi-Ershadi MR, Jafari R, Hanafi-Bojd AA. A new epidemic focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis in central Iran. Ann Saudi Med 2004; 24(22): 98-101.
18. Yaghoobi-Ershadi MR, Hanafi-Bojd AA, Akhavan AA, Zahrai-Ramazani AR, Mohebali M. Epidemiological study in a new focus of cutaneous leishmanisis due to Leishmania major in Ardestan town, central Iran. Acta Trop 2001; 79(2): 115-121.
19. Fakhar M, Mikaeili F, Hatam GR, Habibi P, Karamian M, Motazedian MH, et al. Molecular epidemiology survey of cutaneous leishmaniasis in referral patients to Parasitology lab at Shiraz School of Medicine and importance application of PCR for diagnosis of disease. J Jahrom Univ Med Sci 2010; 8(1): 1-5 (Persian).
20. Motazedian MH, Karamian M, Noyes HA, Ardehali S. DNA extraction and amplification of Leishmania from archived, Giemsa-stained slides, for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis by PCR. Ann Trop Med Parasitol 2002; 96(1): 31-34.
21. Karamian M, Motazedian MH, Fakhar M, Pakshir K, Jowkar F, Rezanezhad H. Atypical presentation of Old-World cutaneous leishmaniasis, diagnosis and species identification by PCR. J Eur Acad Dermatol Venereol 2008; 22(8): 958-962.
22. Pourmohammadi B, Motazedian MH, Hatam GR, Kalantari M, Habibi P, Sarkari B. Comparison of Three Methods for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. Iran J Parasitol 2010; 5(4): 1-8.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-01]