Original Article

تعیین گونه عامل لیشمانیوز جلدی به روش PCR در شهرستان فسا ۱۳۹۱

مهدی شرفی[۱]، بابک پزشکی[۱]، عبداله رئیسی[۱]، محسن کلانتری[۲*]، محمد مهدی نقی زاده[۱]، سولماز دست منش[۳]

۱- دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران.
۲- دانشکده پیراپزشکی ممسنی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.
۳- دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، معاونت بهداشتی، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۰۴/۰۹ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۰۶/۳۱

چکیده

زمینه و هدف: لیشمانیوز یکی از بیماری‌های مشترک بین انسان و دام است که توسط گونه‌های مختلف تک یاخته‌ای از جنس *لیشمانیا* ایجاد شده و توسط انواع پشه خاکی‌های جنس فلبوتوموس منتقل می‌شود. تشخیص گونه‌های لیشمانیوز جلدی به‌صورت میکروسکوپی قابل اطمینان نیست. در میان روش‌ها، PCR برای این منظور به نظر مناسب است. در این مطالعه شناسایی گونه عامل لیشمانیوز جلدی در شهرستان فسا به روش PCR مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در ماه‌های فروردین تا اسفند ۱۳۹۰، از ۱۳۸ مورد مشکوک به لیشمانیوز جلدی که در محدوده فسا بودند نمونه برداری انجام شد. پس از بررسی میکروسکوپی، اسمیرها جهت استخراج DNA و استفاده در آزمایش PCR از سطح لام تراشیده شدند.

نتایج: همه ۱۳۸ اسمیر در بررسی‌های میکروسکوپی و آزمایش PCR مثبت گزارش شدند. در PCR، در یک اسمیر، قطعه ۷۵۰ جفت بازی معرف *Leishmania tropica* و در مابقی اسمیرها قطعه ۵۶۰ جفت بازی معرف *L. major* مشاهده شد.

نتیجه گیری: نمونه‌های لیشمانیوز به‌دست آمده در شهرستان فسا به‌طور عمده از نوع روستایی است که در این نوع، مخزن بیماری جوندگان وحشی به خصوص موش‌های صحرایی هستند، بنابراین جهت کنترل و پیشگیری از این بیماری مبارزه با جوندگان به عنوان یکی از مهم‌ترین استراتژی‌های کنترلی باید در اولویت قرار داده شود. همچنین به نظر می‌رسد، روش مبتنی بر PCR به عنوان یک ابزار مناسب و قدرتمند برای تعیین گونه‌های لیشمانیایی مناسب باشد.

کلمات کلیدی: لیشمانیوز جلدی، شناسایی، ایران.

مقدمه

لیشمانیوز (leishmaniasis) از بیماری‌های مشترک بین انسان و حیوان است که توسط گونه‌های مختلف تک یاخته‌ای از جنس لیشمانیا ایجاد می‌شود و به وسیله انواع پشه خاکی فلبوتوموس ماده منتقل می‌شود. این بیماری به سه فرم جلدی (سالک)، احشایی (کالا آزار) و جلدی ـ مخاطی (اسپوندیا) تظاهر می‌یابد. شایع‌ترین فرم لیشمانیوز، نوع جلدی آن است که به دو صورت خشک (شهری) و مرطوب (روستایی) مشاهده می‌شود (۲ و ۱).

در ایران *لیشمانیا تروپیکا* و *لیشمانیا ماژور* عامل لیشمانیوزیس جلدی می‌باشند. مخازن انگل در این بیماری متفاوت است، به طوری که در نوع *لیشمانیا ماژور* جوندگان وحشی و موش و در نوع *لیشمانیا تروپیکا*، گاهی سگ و انسان (میزبان اتفاقی) به عنوان مخزن انگل محسوب می‌شوند (۴ و ۳). تمام گونه‌ها و سویه‌های متعلق به جنس *لیشمانیا* از نظر مورفولوژیک یکسان هستند و تشخیص گونه‌های لیشمانیوز جلدی به صورت میکروسکوپی و تهیه لام مستقیم امکان پذیر نیست از طرفی استفاده از یافته‌های اپیدمیولوژی و بالینی نیز جهت این امر کافی نیستند. از آنجا که DNA هر انگل مانند سایر موجودات زنده ویژه همان انگل است، می‌توان با استفاده از DNA انگل اقدام به تشخیص و تعیین گونه نمود. در میان روش‌های موجود برای این کار استفاده از روش مولکولی PCR مفید می‌باشد (۶ و ۵).

استان فارس یکی از کانون‌های اندمیک بیماری می‌باشد، به طوری که در سال ۹۰ رتبه دوم را پس از استان ایلام از نظر میزان بروز به خود اختصاص داده است. شهرستان فسا در جنوب استان فارس با میزان بروز ۵۵۰ در صد هزار نفر در سال ۸۶ بالاترین میزان بروز بیماری در کشور را به خود اختصاص داده است.

آخرین اطلاعات مربوط به بروز بیماری در سال ۹۰ در شهرستان فسا ۸۴ مورد به ازای ۱۰۰۰۰۰ نفر و بیشترین میزان شیوع در گروه سنی ۴-۰ سال و سپس ۹-۵ سال می‌باشد.

بیشترین میزان بروز بیماری در ماه‌های آبان و آذر دیده می‌شود. ۹۰ درصد موارد مربوط به دهستان میانده در جنوب شهرستان فسا می‌باشد. میزان بروز بیماری در کل کشور در سال ۹۰، ۲۶ مورد در ۱۰۰۰۰۰ نفر می‌باشد (۷). اکثر تحقیقاتی که تاکنون در زمینه این بیماری صورت گرفته است به روش درمان و شیوع سنجی تمرکز

* نویسنده مسئول: محسن کلانتری، دانشکده پیراپزشکی ممسنی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران. تلفن: ۰۷۳۱-۲۲۱۴۲۰۱
Email: kalantari_m@sums.ac.ir

داشته است. از آنجا که تحقیقات چندانی در زمینه شناسایی گونه‌های بیماری در این شهرستان صورت نگرفته است، لذا بر آن شدیم تا این تحقیق را با هدف بررسی گونه‌های مختلف لیشمانیوز جلدی به انجام برسانیم.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مقطعی، نمونه‌گیری از فروردین تا اسفند ۹۰ در شهرستان فسا به طول انجامید. ابتدا کانون‌های آلوده را با توجه به میزان بروز بیماری در سال قبل تعیین نموده و از کلیه افرادی که دارای ضایعه مشکوک به لیشمانیوز جلدی بوده و توسط پزشک به آزمایشگاه ارجاع داده می‌شدند، پس از تکمیل فرم بررسی، نمونه برداری در شرایط استریل انجام شد. از ۱۳۸ بیمار مشکوک، دو لام تهیه و به روش گیمسا رنگ آمیزی گردید. نمونه برداری با بیستوری و از زیر زخم و با برداشت بافت حاوی ماکروفاژها صورت گرفت و پس از رنگ آمیزی با گیمسا، با بزرگنمایی ۱۰۰ جهت دیدن انگل مورد بررسی قرار گرفتند. سپس سطح لام‌های مثبت تراشیده شده و جهت PCR مورد استفاده قرار گرفتند.

استخراج DNA: استخراج DNA نمونه‌ها با استفاده از روش فنل-کلروفرم و پروتئیناز k انجام شد (۸). روش کار بدین ترتیب بود که نمونه رنگ آمیزی شده سطح لام را داخل میکروتیوب ۱/۵ سی سی ریخته و ۲۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده و ۵ میکرولیتر پروتئیناز k به آن افزوده شد و به مدت دو ساعت در انکوباتور در دمای ۵۶ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. سپس به محتویات میکروتیوب‌ها ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط فنل-کلروفرم-ایزوآمیل الکل اضافه گردید و پس از مخلوط کردن، به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۵۰۰۰ rpm سانتریفوژ شدند. در این مرحله سه لایه مشاهده شد که مایع رویی حاوی DNA، لایه وسط شامل چربی‌ها و پروتئین‌ها و لایه زیرین مخلوط فنل-کلروفرم-ایزوآمیل بودند. محلول رویی (حدود ۱۵۰-۱۰۰ میکرولیتر) را با دقت جداکرده و در یک میکروتیوب جدید ریخته و دو برابر حجم آن ایزوپروپانول (حدود ۳۰۰-۲۰۰ میکرولیتر) و یک دهم حجم (حدود ۱۵-۱۰ میکرولیتر) استات سدیم ۳ مولار به آن اضافه شد. پس از مخلوط کردن نمونه‌ها در میکروتیوب‌ها، آن‌ها را به مدت حداقل ۴۰ دقیقه دردمای ۲۰- درجه سانتیگراد فریز کرده و بعد از خارج کردن نمونه‌ها از فریزر به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ شدند. مایع رویی دور ریخته شده و بعد از خشک شدن رسوب، ۵۰ میکرولیتر آب مقطر به آن اضافه گردید و پس از مخلوط کردن، از آن برای انجام واکنش PCR استفاده شد.

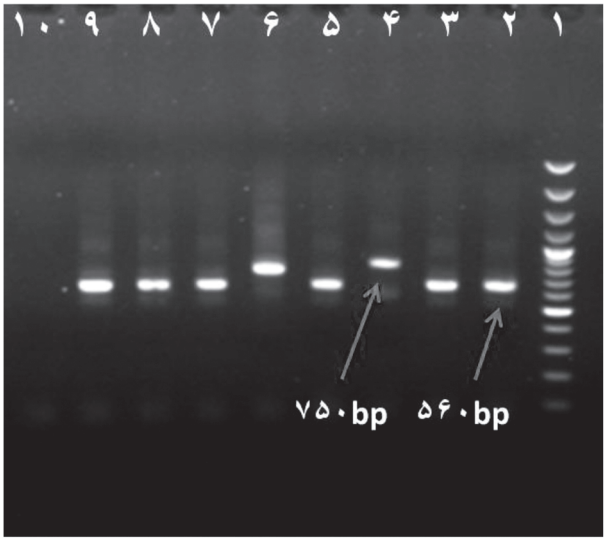
PCR: پرایمرهای CSB1XR (ATTTTTCGCGATTTTCGCA-GAACG) و CSB2XF (CGAGTAGCAGAAACTCCCGTTCA) در مرحله اول و پرایمرهای 13Z-(ACTGGGGGTTGGTGTAAA TAG) و LIR (TCGCAGAACGCCCCT) جهت مرحله دوم مورد استفاده قرار گرفتند. در مرحله اول هر ۲۵ میکرولیتر محلول واکنش حاوی ۵ میکرولیتر DNA (با غلظت ۲۰۰ نانوگرم)، ۱/۵ میلی مولارکلرید منیزیم، ۰/۲ میلی مولار داکسی ریبو نوکلوئیک اسید (dNTP mix)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10x)، یک واحد تک دی ان آ پلی مراز و ۱۰ میکرومول پرایمر CSB1XR و CSB2XF (محصول شرکت سیناژن) بود. برنامه استفاده شده در دستگاه ترموسایکل (Mastercycler gradient; Eppendorf AG، Hamburg، Germany) شامل: دمای دناتوراسیون ۵ دقیقه در ۹۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و به دنبال آن ۳۰ سیکل شامل، ۴۵ ثانیه در ۹۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۱/۵ دقیقه در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و سپس در نهایت به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند.

سپس محصول این مرحله از PCR به میزان ۱ به ۹ با آب خالص رقیق سازی شده و سپس ۱ میکرولیتر از این محلول رقیق در مرحله دوم PCR استفاده شد. تمام مراحل مانند مرحله‌ی اول PCR می‌باشد بجز اینکه بجای پرایمرهای مرحله اول از پرایمرهای LiR و 13Z استفاده گردید و همچنین حجم کل محلول واکنش به ۳۰ میکرولیتر افزایش یافت (۱۰ و ۹).

۵ میکرولیتر از نمونه محصول مرحله دوم PCR برای الکتروفورز درون چاهک‌هایی که بر روی ژل آگاروز با غلظت ۱/۵٪ نشاندار شده با اتیدیوم بروماید ریخته شد و سپس به وسیله ی نور ماوراء بنفش بررسی گردید (۹).

اندازه‌ی هرمحصول مشاهده شده در مقایسه با مارکر (ladder) و نمونه کنترل مثبت مقایسه گردید.

برای انجام کنترل‌های مثبت، از DNA استخراج شده از کشت‌های پروماستیگوت مرجع از انگل *L. major* (MHOM/ir/54 lv39) و انگل *L. tropica* (MHOM/ir/89/ARAZ) که روی هر ژل ایجاد شده بود استفاده شد (۱۱).



تصویر ۱ـ نتایج PCR نمونه های جدا شده از بیماران کانون فسا: مارکر اندازه (شماره ۱)، کنترل مثبت *Leishmania major* (شماره ۲)، کنترل مثبت *L. tropica* (شماره ۴)، کنترل منفی (شماره ۱۰)، بیماران مبتلا به *L. major* (شماره های ۳، ۵، ۷، ۸ و ۹)، بیمار مبتلا با *L. tropica* (شماره ۶)

نتایج

این مطالعه نشان داد که از ۱۳۸ نمونه تهیه شده، ۱۳۷ نمونه *لیشمانیا ماژور* و یک نمونه *لیشمانیا تروپیکا* بود، که این یک نمونه هم

طبق بررسی‌های انجام شده مورد وارده محسوب می‌شود. با توجه به اینکه ۱۰۰٪ نمونه‌ها مربوط به *L. major* بود ارتباطی بین گونه انگل و تعداد ضایعه، سن، جنس و نوع ضایعه بیماران وجود ندارد. میانگین سنی بیماران ۱۹/۲۶ سال، ۵۱ درصد افراد دارای ضایعه مرطوب، ۴۹ درصد دارای ضایعه خشک،۵۲ درصد افراد مذکر و ۴۸ درصد مؤنث بودند، ۵۷ درصد افراد مربوط به بخش شیبکوه و ۱۷ درصد افراد مربوط به ششده، ۲۶ درصد بخش مرکزی و فسا می‌باشند.۳۰ درصد افراد دارای یک ضایعه، ۲۹ درصد دو ضایعه، ۲۱ درصد سه ضایعه، ۷ درصد چهار ضایعه، ۴/۵ درصد پنج ضایعه و ۳ درصد دارای ۸ ضایعه بودند (جدول ۱).

با توجه به تابلو بالینی بسیار گسترده و پیچیده ضایعات پوستی و موارد تشخیص افتراقی متعدد، تشخیص بیماری در کانون‌های بومی به صورت آزمایشگاهی انجام گیرد از طرف دیگر چون روش مستقیم تشخیص بیماری به علت عدم امکان تهیه مناسب نمونه از حساسیت کافی برخوردار نیست، در مواردی که تعداد آموستیگوت‌های انگل در اسلاید بسیار کم بوده و امکان تشخیص به حداقل می‌رسد، روش مولکولی PCR بر روی اسلایدها جهت تشخیص بیماری و تعیین گونه انگل استفاده شود (۱۳).

شواهد مولکولی و اپیدمیولوژیکی استان فارس نشان می‌دهد که گونه *لیشمانیا ماژور* در این استان گونه غالب می‌باشد. در مطالعه

جدول ۱ ـ ارتباط بین گونه انگل *لیشمانیا* و سن، جنس و نوع ضایعه در بیماران مبتلا به لیشمانیوز در کانون فسا

نوع انگل	تعداد	سن (میانگین)	جنسیت (درصد)		نوع ضایعه	
			زن	مرد	خشک	مرطوب
لیشمانیا ماژور	۱۳۷	۱۹/۳۸	۵۱/۱	۴۸/۹	۴۸/۲	۵۱/۸
لیشمانیا تروپیکا	۱	۱۸	-	۱	*	-

بحث

تا قبل از پیدایش روش‌های جدید، شناسایی و تفکیک گونه‌های انگل با مشکلات زیادی توأم بوده است و از راه‌های پیچیده‌ای برای این منظور استفاده می‌گردید. علائم کلینیکی، اپیدمیولوژی بیماری، بررسی ناقلین، توانایی ایجاد بیماری در حیوانات آزمایشگاهی و رشد در محیط کشت از فاکتورهایی بودند که برای تشخیص گونه انگل به کار می‌رفتند. اما امروزه با شناخت ژن‌ها و استفاده از روش‌های تشخیص مولکولی، مشکلات روش‌های فوق، مشاهده نمی‌شود و با استفاده از DNA موجودات، می‌توان به راحتی گونه انگل را تعیین نمود (۱۳و۱۲). روش‌های مختلف PCR بدین منظور استفاده می‌شود. حاتم و همکاران تعدادی از بیماران مبتلا به سالک ساکن استان فارس را با روش‌های ایزو آنزیم و PCR مورد بررسی قرار داده که کلیه نمونه‌های مورد بررسی، *لیشمانیا ماژور* تشخیص داده شدند، و این موضوع را نشانه‌ای از افزایش گسترش این گونه لیشمانیا در ایجاد لیشمانیوز پوستی در استان فارس می‌داند (۱۴). بنی مصطفوی در سال ۱۳۸۵ با بررسی دموگرافیک لیشمانیوز پوستی در طی ده سال ۸۳-۷۳ و استفاده از اطلاعات جغرافیایی (GIS) در اپیدمیولوژی استان فارس نشان داد که بیشترین میزان شیوع بیماری در شرق استان فارس و مربوط به شهرستان نی ریز می‌باشد (۱۵).

حاضر، اختلاف معنی‌داری بین میزان ابتلا جنس مذکر و مؤنث دیده نشد. بر اساس نتایج بدست آمده از مطالعه مذکور فصل پاییز و زمستان بیشترین میزان بروز بیماری و فصل بهار کمترین میزان را به خود اختصاص داده است. این الگوی فصلی با گونه غالب انگل در شهرستان فسا مطابقت دارد. نتایج بدست آمده در این مطالعه با مشاهدات قاسمیان و همکاران در اهواز مطابقت دارد (۱۵).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتیجه آزمایش‌های PCR، شهرستان فسا را می‌توان به عنوان کانون لیشمانیوز روستایی (مرطوب) به حساب آورد. در این نوع لیشمانیوز، مخزن بیماری جوندگان وحشی به خصوص موش‌های صحرایی و ناقل بیماری عمدتاً پشه خاکی از نوع *فلبوتوموس پاپاتاسی* است. شهرستان فسا از کانون‌های مهم آندمیک بیماری لیشمانیوز جلدی نوع روستایی به شمار می‌رود. در این منطقه آلوده‌ترین ناحیه دهستان میانده (با میزان بروز ۸۷ در ۱۰۰۰ نفر در جمعیت زیر ۶ سال) به عنوان ناحیه هایپرآندمیک در نظر گرفته می‌شود. بنابراین جهت کنترل و پیشگیری از این نوع بیماری در این شهرستان برنامه مبارزه با جوندگان و ناقلین به عنوان یکی از مهم‌ترین استراتژی‌های کنترلی این بیماری باید در اولویت قرار داده شود.

References

1. Jamal khan SJ, Muneeb S. Cutaneous leishmaniasis in Pakestan. Dermatol Online J. 2005; 11 (1):4-10.
2. Nadim A. Diseases with carriers. Tehran: Eshtiagh; 2000.P.52-4. [In Persian]
3. Markel E. Medical Parasitology. Translated by Jalallu N, Kamrani M. Tehran: Tabib; 1999.P. 85-59. [In Persian]
4. Molyneux DH, Ashford RW. The biology of trypanosome and leishmania parasite of man domestic animals. London, Taylor and Francis; 1983.
5. Macdonald MH, Morrison CJ, McMaster WR. Analysis of the active site and activation mechanism of the leishmania surface metalloporoteinase GP63. Biochim Biophys Acta.1995; 253(2):199-207.
6. Ardahani S. Leishmania Parasite and Leishmaniasis. Tehran: Nashre Daneshgahi;1994. [In Persian]

7. Center for Communicable Disease Management. Health Department Fasa University of Medical Sciences. 1390. [In Persian]
8. Motazedian H, Karamian M, Noyes H A, 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.
9. Davami MH, Motazedian MH, Kalantari M, Asgari Q, Badzohre A, Mohammadpour I. First microscopical and molecular-based characterization of Leishmania major within naturally infected Phlebotomus salehi (Diptera; Psychodidae) in Fars province, southern Iran. Ann Trop Med Parasitol. 2011; 105 (7): 485–91.
10. Azizi K, Badzohreh A, Sarkari B, Fakoorziba MR, Kalantari M, Djaefar Moemenbellah-Fard, et al. Nested polymerase chain reaction and sequence- based detection of Leishmania infection of sand flies in recently emerged endemic focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis, southern Iran. Iranian J Med Sci. 2013; 38 (SUPPL 2): 156-162. [Article in Persian]
11. Pourmohammadi B, Motazedian MH, Kalantari M. Rodent infection with Leishmania in a new focus of human cutaneous leishmaniasis, in northern Iran. Annals Trop Med Parasitol. 2008; 102 (2): 127–133.
12. Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HDFH, Presber W, et al. PCR diagnosis and characterization of Leishmania in local and imported clinical samples. Diagn Microbiol Infect Dis. 2003; 47(1): 349-58.
13. Ghasemian M, Maraghi S, Samarbafzadeh AR, Jelowdar A, Kalantari M. The PCR-based detection and identification of the parasites causing human cutaneous leishmaniasis in the Iranian city of Ahvaz. Ann Trop Med Parasitol. 2011; 105(3): 209-15.
14. Hatam GR, Rezanezhad H, Motazedian M H, Sarkari B. In Vitro Infectivity of Leishmania major Isolated from Patients with Different Clinical Forms of Cutaneous Leishmaniasis and Its Association with Parasite Zymodems. Iranian J Parasitol. 2009; 4(3): 52-60. [Article in Persian]
15. Banomostafavi E. Demographic review of reported cases of cutaneous leishmaniasis in Fars province from 1373 to 1383 (G.P. thesis). Shiraz University of Medical Science, 2006. [In Persian]

Original Article

Detection of Cutaneous Leishmaniasis by PCR in Fasa district in 2012

Sharafi M[1], Pezeshki B[1], Reisi A[1], Kalantari M[2*], Naghizadeh MM[1], Dast-manesh S[1]

1- Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran.
2- Mamasani Paramedical School, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
3- Hormozgan University of Medical Sciences, Iran.

Received: 30 Jun 2013 Accepted: 22 Sep 2013

Abstract

Background & Objective: Leishmaniasis is a common disease between humans and animals caused by protozoa of the genus Leishmania spp. It is transmitted by the female species of Phlebotomus.The most common form of leishmaniasis is the cutaneous form seen as either dry (urban) or wet (Rural). Detection of cutaneous leishmaniasis species is not reliable by microscopy. Among the methods, PCR is useful for this purpose. In this study, we aimed to investigate the cutaneous leishmaniasis species by PCR method in Fasa district.

Materials & Methods: Slit biopsies were collected from 138 suspected cases of cutaneous leishmaniasis who were presented, consecutively, in Fasa district from April 2011 to February 2012. After the microscopy, the entire smear was then scraped off the slide surface for DNA extraction and PCR assay.

Results: All 138 investigated smears were reported positive by microscopy and nested PCR assay. In PCR, One of the smears had the 750-bp band, indicative of L. tropica and the rest had the 560-bp band indicative of L. major.

Conclusion: In conclusion, the cutaneous leishmaniasis found in Fasa district is predominantly Rural Cutaneous Leishmaniasis. The PCR-based assay used in the present study appears to be a suitable and powerful tool for the characterization of Leishmanial species.

Keywords: **Cutaneous Leishmaniasis, detection, Iran.**

*** Corresponding author: Kalantari M,** Mamasani Paramedical School, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
Tel: +98 731 2224201
Email: Kalantari_m@sums.ac.ir