Medical Journal of Mashhad
University of Medical Sciences
Vol. 53, No. 3, P: 138- 144
Autumn 2010

مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
سال ۵۳، شماره ۳
پاییز ۸۹، صفحه ۱۳۸- ۱٤٤

مقاله اصلی

شناسایی مولکولی گونه های عامل لیشمانیوز جلدی در شهرستان سبزوار

تاریخ دریافت: ۸۸/۹/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۸۹/۱/۱۷

[۱]مسعود مهاجری
[۲]سید علی اکبر شمسیان*
[۳]عبدالرحیم رضایی
[۴]کاظم حسن پور
[۵]محمد تقی شاکری
[۶]غلامرضا فرنوش
[۷]فرهاد فتحی مقدم

۱- دانشیار گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۲- استادیار جهاد دانشگاهی مشهد ، مشهد، ایران
۳- استادیار گروه ویروس شناسی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۴- متخصص کودکان
۵- دانشیار گروه پزشکی اجتماعی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۶- کارشناس ارشد انگل شناسی
۷- مربی پژوهش جهاد دانشگاهی مشهد، مشهد، ایران

*مشهد- پردیس دانشگاه، جهاد دانشگاهی مشهد
تلفن:۸۸۳۲۳۷ -۵۱۱-۹۸+
email:Alishamsian@yahoo.com

خلاصه

مقدمه

لیشمانیازیس جلدی یک عفونت انگلی است که به عنوان یک مشکل بهداشتی در بخشهایی از ایران بویژه شهرستان سبزوار در استان خراسان رضوی محسوب می شود. مخازن بیماری در دو فرم خشک و مرطوب متفاوت است، لذا جهت مبارزه با این بیماری تعیین گونه انگل لازم است.DNA هر انگل همانند سایر موجودات زنده ویژه همان انگل است، لذا می توان با استفاده از آن اقدام به تعیین گونه نمود. در این مطالعه با استفاده از تکنیک PCR گونه های انگل عامل لیشمانیازیس جلدی مشخص شده است.

روش کار

این مطالعه توصیفی مقطعی در سال ۱۳۸۶-۱۳۸۷ در شهرستان سبزوار انجام شده است. نمونه تهیه شده از زخم ۸۶ بیمار که با استفاده از روش لام مستقیم وجود انگل در آنها تایید شده بود، در محیطهای کشت NNN و سپس RPMI-1640 کشت داده شد. پس از کشت انبوه و استخراج DNA با استفاده از ۴ روش مختلف استخراج DNA با استفاده از یک جفت پرایمر اقدام به انبوه سازی DNA کینتوپلاست انگل شد. الگوی الکتروفوروزی هر نمونه با گونه های استاندارد لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا ماژور مقایسه شد. از نرم افزار SPSS برای تجزیه تحلیل اطلاعات استفاده شد، همچنین آزمون های آماری تی، کای اسکوئر و من ویتینی مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

روش جوشاندن نمی تواند روش مناسبی جهت استخراج DNA از پروماستیگوتهای لیشمانیازیس جلدی باشد. اما ارزش روش های بر پایه فنل- کلروفرم معادل کیت کیاژن است. نتایج حاصل از الگوهای PCR حاکی از آن بود که دو نوع انگل لیشمانیا تروپیکا(۳۲ مورد) و لیشمانیا ماژور(۵۴) عامل لیشمانیازیس جلدی در شهرستان سبزوار می باشند.

نتیجه گیری

بر خلاف مطالعات سالهای گذشته در شهرستان سبزوار هر دو نوع انگل لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا ماژور وجود دارند. ضمن اینکه روشهای بر پایه فنل-کلروفرم روشهای مناسبی جهت استخراج DNA از پروماستیگوتهای انگل لیشمانیا بوده و PCR نیز تکنیک ارزشمندی جهت تعیین گونه انگل در مطالعات اپیدمیولوژیک می باشد.

کلمات کلیدی: لیشمانیازیس جلدی ، لیشمانیا ماژور ، لیشمانیا تروپیکا ، PCR

This page was created using **Nitro PDF** trial software.
To purchase, go to http://www.nitropdf.com/

مقدمه

لیشمانیازیس جلدی یک عفونت انگلی پوستی است که توسط گونه های مختلف انگل های جنس لیشمانیا ایجاد می شود. در ایران لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا ماژور عوامل لیشمانیازیس جلدی می باشند. مخازن انگل در این بیماری متفاوت است، به طوری که در نوع لیشمانیا ماژور، جوندگان وحشی و موش و در نوع لیشمانیا تروپیکا، انسان و گاهی سگ (میزبان اتفاقی) به عنوان مخزن انگل محسوب می شوند(۱،۲). ضایعات از نظر بالینی به دو صورت خشک و مرطوب هستند (۳- ۵).

این بیماری به عنوان یک مشکل بهداشتی در بخشهایی از ایران از جمله شهرستان سبزوار در استان خراسان رضوی محسوب می شود. شهرستان سبزوار از جمله کانون های مهم لیشمانیازیس خشک توسط دکتر ندیم در دهه ۴۰ شمسی مطرح شد اما تاکنون مطالعات بیشتر و دقیقتری در این زمینه صورت نگرفته است. با توجه به عدم انجام مطالعات مدون و دقیق در این کانون بعد از دهه ۴۰ و همچنین اهمیت شناسایی گونه ها، جهت مبارزه با مخازن و میزبانان لیشمانیازیس جلدی و پیشگیری از بیماری و بروز موارد مقاوم به درمان، تعیین گونه های مولد لیشمانیازیس جلدی در این شهرستان ضروری می نمود(۶). تمام گونه ها و سویه های متعلق به جنس لیشمانیا از نظر مورفولوژیک یکسان هستند و تشخیص گونه های لیشمانیوز جلدی به صورت میکروسکوپی و با تهیه لام مستقیم و کشت امکان پذیر نیست(۷). از آنجایی که مخازن بیماری در دو گونه انگل متفاوت است لذا جهت مبارزه با این بیماری تعیین گونه انگل الزامی است. از طرفی استفاده از یافته های اپیدمیولوژی و بالینی نیز جهت این امر کافی نیستند. از آنجایی که DNA هر انگل به مانند سایر موجودات زنده ویژه همان انگل است، می توان با استفاده از DNA انگل اقدام به تشخیص و تعیین گونه نمود. در میان روشهای موجود برای این کار، استفاده از روشهای مولکولی بویژه PCR مفید می باشد. بر اساس شواهد موجود شهرستان سبزوار از کانون های مهم این بیماری محسوب می شود و تا کنون مطالعات لازم و کلاسیک در زمینه وضعیت لیشمانیازیس جلدی در این شهرستان انجام نشده بود، بنابراین هدف از این مطالعه تعیین گونه های انگل عامل لیشمانیازیس جلدی با روش PCR است (۸، ۹).

روش کار

این مطالعه توصیفی-مقطعی در سال ۱۳۸۶-۱۳۸۷ در مراکز نمونه گیری شهرستان سبزوار انجام شده است.۸۶ بیمار که دارای شرایط لازم بوده و تا پایان طرح همراهی نمودند شرکت داشتند. از بیمارانی که دارای ضایعات مشکوک به لیشمانیازیس جلدی بوده و توسط پزشک به آزمایشگاه ارجاع داده می شدند، پس از اخذ رضایت نامه از بیماران و تکمیل پرسشنامه، نمونه برداری در شرایط کاملا استریل انجام می شد. از هر بیمار دو لام از ضایعه تهیه وبه روش گیمسا رنگ آمیزی می گردید. نمونه برداری با بیستوری و از زیر زخم و با برداشت بافت حاوی ماکروفاژ صورت می گرفت. بعد از تهیه لام از خونابه های ضایعه که در اثر نمونه برداری ایجاد شده بود آسپیراسیون با استفاده از سرنگ انسولین حاوی نیم سی سی سرم فیزیولوژی استریل انجام می گرفت. لامها پس از رنگ آمیزی در زیر میکروسکوپ با بزرگنمائی ۴۰x و ۱۰۰x برای مشاهده آماستیگوتها مورد بررسی قرار می گرفتند، در صورت مشاهده آماستیگوتها سرم فیزیولوژی حاصل از آسپیره کردن زخم به درون محیط کشت NNN تهیه شده از قبل وارد می شد. با ازای هر میلی لیتر محیط کشت NNN مقدار ۲۵۰ تا ۵۰۰ واحد پنی سیلین و ۲ میلی گرم استرپتومایسین به آن اضافه کرده تا آلودگی های احتمالی به میکروبها کاهش یابد. محیط کشت‌ها پس از تکان دادن، در انکوباتور در دمای ۲۵°C به صورت شیب دارنگهداری شد. لازم به توضیح است کلیه مراحل فوق در شرایط کاملا استریل و در کنار شعله انجام می گرفت. بعد از ۳ تا ۴ روز با برداشت یک قطره از محیط کشت NNN و تهیه لام مرطوب اقدام به بررسی اشکال پروماستیگوت انگل شد. در صورت مشاهده پروماستیگوتهای دارای تاژک، با استفاده از لام نئوبار اقدام به شمارش آنها کرده و در صورتی که تعداد آنها به یک میلیون تا دو میلیون در سی سی می رسید به محیط کشت PMI - 1640 حاوی سرم جنین گوساله دکمپلمانه جهت انبوه سازی پروماستیگوتها انتقال داده می شد. بعد از گذشت حدوداً یک هفته و به انبوه رسیدن پروماستیگوتها، محیط کشت RPMI - 1640 حاوی انگل سانتریفوژ شده و پروماستیگوتها جهت استخراج DNA جدا و با PBS شستشو می شدند.

This page was created using **Nitro PDF** trial software.
To purchase, go to http://www.nitropdf.com/

جهت استخراج DNA پس از مقایسه چهار روش فنل-کلروفرم با پروتئیناز k و بدون پروتئیناز k، کیت کیاژن و Boiling، استفاده از روش فنل-کلروفرم با پروتئیناز k با توجه به حساسیتی که این روش در استخراج حداقل DNA نمونه داشت مورد استفاده قرار گرفت. روش کار بدین ترتیب بود که ۱۰۰λ از نمونه پروماستیگوتها را داخل میکروتیوب ۱/۵ سی‌سی ریخته و ۲۰۰λ بافر لیز و ۲۰λ پروتئیناز K به آن اضافه می شد. پس از میکروفیوژ کردن آنها به مدت یک ساعت در بن‌ماری ۵۶°C قرار داده شدند. سپس هم حجم محتویات داخل (۳۰۰λ) به آن فنل-کلروفرم اضافه کرده و پس از ورتکس کردن به مدت ۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰rpm سانتریفوژ شد. در این مرحله سه لایه دیده می‌شود که مایع روئی حاوی DNA، لایه وسط شامل چربی‌ها و پروتئین‌ها (به صورت خط کدری دیده می‌شود) و لایه زیرین همان فنل-کلروفرم است. محلول روئی را با دقت جدا کرده و در یک میکروتیوب جدید ریخته و هم‌حجم خودش (۳۰۰λ- ۲۰۰) فنل به آن اضافه نموده و پس از ورتکس کردن به مدت ۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰rpm سانتریفوژ شد. محلول روئی را با دقت جدا کرده و در یک میکروتیوب جدید ریخته هم حجمش ایزوپروپانول (۳۰۰λ- ۲۰۰) و یک دهم حجم (۳۰λ- ۲۰) استات سدیم به آن اضافه شد. پس از ورتکس کردن میکروتیوب‌ها، آنها را به مدت حداقل ۱۰ دقیقه در ۲۰°C- فریز کرده و بعد از خارج کردن نمونه ها از فریزر به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰rpm سانتریفوژشد.

مایع روئی دور ریخته شد و بعد از خشک شدن رسوب به آن الکل ۷۰ درجه هم‌حجم ایزوپروپانول به آرامی اضافه شد. در این مرحله بدون ورتکس کردن به مدت ۵ دقیقه در ۵۰۰۰rpm سانتریفوژ انجام شد.در پایان مایع روئی را دور ریخته و بعد از خشک شدن رسوب (DNA)، ۵۰ میکرولیتر آب مقطر به آن اضافه کرده وپس از ورتکس کردن از آن برای PCR استفاده شد در صورت انجام PCR در روزهای بعد نمونه ها در فریزر ۲۰°C- قرار می گرفتند.

جفت پرایمرهای DNA واکنش PCR، الیگونوکلئوتیدهای سنتتیک بودند که با الگوی kDNA انگل لیشمانیا دنوانی و توالی(F:(5' TCGCAGAACGCCCCTACC 3'، R:(5' AGGGGTTGGTGTAAAATAGG 3') توسط شرکت طوبی نگین ساخته شدند. تکثیر DNA الگوی انگل لیشمانیا با این پرایمر به صورتی است که انگل لیشمانیا ماژور باند ۶۰۰bp و لیشمانیا تروپیکا باند ۸۰۰bp راتشکیل می‌دهد (۱۰).

جهت Setup آزمایش از دماهای Annealing مختلف (۵۶، ۵۸، ۶۰/۶ و ۶۲ درجه) و دو غلظت 0.8 µl و 0.6 µl Mgcl2 مختلف استفاده شد که در نهایت در دمای ۶۰/۶ درجه و غلظت 0.8 µl بهترین باندها برای هر دو گونه انگل مشاهده شد. همچنین برای کارهای خود از غلظت ۲λ جهت DNA الگو و حجم ۲۰λ جهت واکنش استفاده شد.

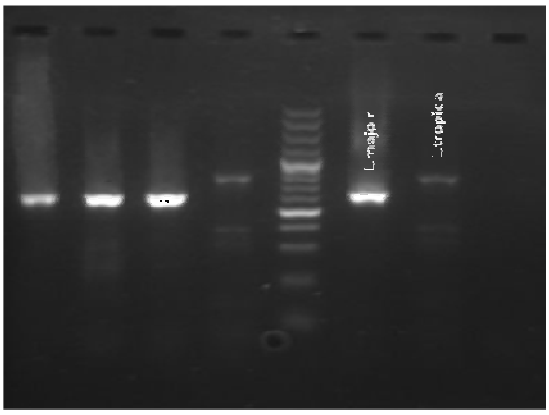
برای این منظور ۲ لاندا از محصولات PCR را در چاهکهای ژل ریخته و برای مشخص شدن اندازه باند DNA از مارکری با اندازه ۱۰۰bp استفاده شد و ۱ لاندا از این مارکر در هر الکتروفورز در وسط ستون هر ردیف ریخته شد. همچنین از یک لودینگ بافر به عنوان رنگ و ماده تثبیت کننده که باعث سنگینی محصول PCR و فرورفتن آن در چاهک ژل می‌شود استفاده گردید. بعد از ریختن محصولات PCR و مارکر در چاهک‌ها، در هر مرحله PCR دو نمونه استاندارد انگلها (سویه لیشمانیا ماژور MRHO/IR/75/ER و سویه لیشمانیا تروپیکا MHOM/IR/01/yaza که از انیستیتو پاستور ایران خریداری شده بود) و یک نمونه کنترل منفی نیز در کنار نمونه ها در چاهکها قرار داده شد. سپس تانک به دستگاه تغذیه متصل شد. مدت زمان لازم جهت جدا شدن کامل باندها از یکدیگر با این شرایط حدود ۳۰ دقیقه بود. سپس ژل را خارج کرده و در دستگاه UVdoc جهت مشاهده باندها قرار داده شد. جهت تجزیه و تحلیل اطلاعات از نرم افزار SPSS و آزمون های آماری تی، من ویتینی و کای اسکوئر استفاده شد.

نتایج

از مجموع ۸۶ نمونه، ۳۲ نمونه لیشمانیا تروپیکا و ۵۴ نمونه لیشمانیا ماژور بودند (شکل ۱).

تعداد بیماران جنس مونث (۵۲ نفر) بیشتر از جنس مذکر (۳۴ نفر) بود.اختلاف معنی داری بین جنس و گونه لیشمانیا مشاهده شد ($p>0/05$) (جدول ۱).

This page was created using **Nitro PDF** trial software.
To purchase, go to http://www.nitropdf.com/



شکل ۱- الگوی به دست آمده از واکنش PCR ژن kDNA با پرایمر مربوطه ، چاهک ۵ مارکر با اندازه ۱۰۰bp، چاهکهای ۱تا ۳ نمونه بیماران مبتلا به گونه لیشمانیا ماژور با وزن مولکولی ۶۰۰bp، چاهک ۴ نمونه بیماران مبتلا به گونه لیشمانیا تروپیکا با وزن مولکولی ۸۰۰bp، چاهک ۶ نمونه استاندارد گونه لیشمانیا ماژور، چاهک ۷ نمونه استاندارد گونه لیشمانیا تروپیکا و چاهک ۸ کنترل منفی می باشد.

جدول ۱- تعداد مبتلایان به لیشمانیازیس جلدی به تفکیک جنس در شهرستان سبزوار از مهرماه ۸۶ تا آبان ماه ۸۷

جنس	گونه				جمع	
	تروپیکا		ماژور			
	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد
مذکر	۱۰	۱۱/۶	۲۴	۲۷/۹	۳۴	۳۹/۵
جمونث	۲۲	۲۵/۶	۳۰	۳۴/۹	۵۲	۶۰/۵
جمع	۳۲	۳۷/۲	۵۴	۶۲/۸	۸۶	۱۰۰/۰

در بررسی دو گونه لیشمانیا، در نوع تروپیکا بیشترین نمونه مربوط به یک زخم با تعداد ۱۶ بیمار بود در حالی که در گروه های بیشتر از شش زخم هیچگونه نمونه ای مشاهده نگردید. در نوع ماژور بیشترین نمونه مربوط به گروه یک زخم با تعداد ۲۱ بیمار بود در حالی که در گروه بیشتر از شش زخم کمترین نمونه با ۲ مورد مشاهده شد. ارتباط معنی داری بین تعداد زخم ها و گونه انگل وجود نداشت ($p>۰/۰۵$).

جدول ۲- نوع زخمها در مبتلایان به لیشمانیازیس جلدی به تفکیک گونه در شهرستان سبزوار

نوع زخم	تروپیکا		ماژور		جمع	
	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد
خشک	۲۲	۲۵/۵	۱۰	۱۱/۶	۳۲	۳۷/۱
ترشح دار	۸	۹/۳	۲۱	۲۴/۴	۲۹	۳۴/۷
چرکی	۰	۰/۰	۱۷	۲۰/۰	۱۷	۲۰/۰
دو نوع زخم	۲	۲/۴	۶	۶/۸	۸	۹/۲
جمع	۳۲	۳۷/۲	۵۴	۶۱/۸	۸۶	۱۰۰

در بررسی میانگین اندازه زخمها در مبتلایان در هر دو گونه لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا ماژور بیشترین نمونه در اندازه ۱۱ تا ۲۰ میلی متر و کمترین در اندازه بیشتر از ۴۰ میلی متر قرار داشت. بین اندازه زخمها وگونه انگل ارتباط معنی داری دیده شد ($p<۰/۰۵$).

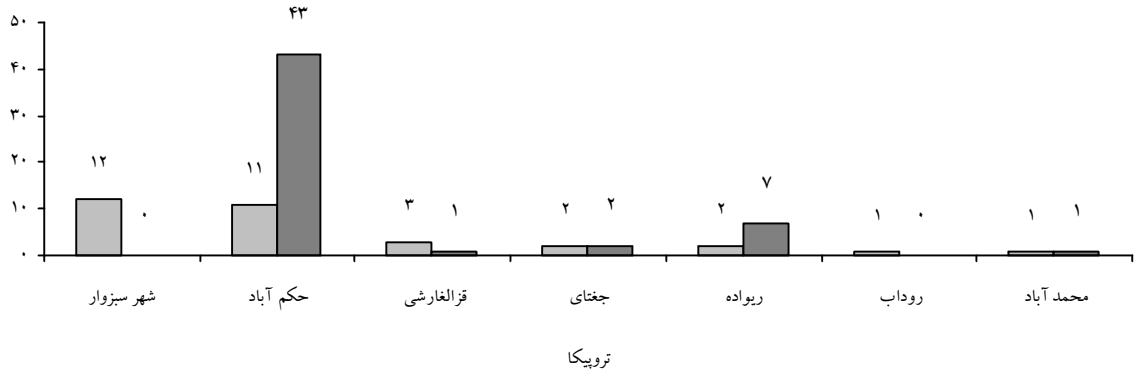
در مقایسه بین دو گونه در لیشمانیا تروپیکا نوع خشک با داشتن ۲۲ مورد بیشترین نمونه را به خود اختصاص داده در حالی که در لیشمانیا ماژور بیشترین نمونه مربوط به نوع مرطوب است. ضمنا ۸ مورد از بیماران دو نوع زخم را بر بدن خود داشتند ارتباط بین نوع زخمها و گونه انگل معنی دار بود($p<۰/۰۵$)(جدول ۲).

در بررسی زمان بروز زخمها در بیمارانی که مبتلا به گونه لیشمانیا تروپیکا بوده اند، بیشترین نمونه ها در فصل بهار با ۱۲ نمونه و کمترین در فصل زمستان با ۴ نمونه مشاهده شدند. در بیماران مبتلا به گونه لیشمانیا ماژور بیشترین نمونه مربوط به فصل تابستان با ۳۸ نمونه و کمترین نمونه مربوط به فصل زمستان با ۱مورد بود. ارتباط بین زمان بروز زخمها و گونه انگل نیز معنی دار بود ($p<۰/۰۵$).

۴ نفر از بیماران دارای سابقه ابتلای قبلی به لیشمانیازیس جلدی بودند که هر ۴ نفر مبتلا به گونه لیشمانیا تروپیکا بودند در حالی که در مبتلایان به لیشمانیا ماژور سابقه قبلی مشاهده نشد ($p<۰/۰۵$).

در بررسی لامهای تهیه شده از زخم، در بیماران مبتلا به انگل لیشمانیا تروپیکا، لامهای با تعداد انگل زیاد با ۱۹/۶ درصد بیشترین را به خود اختصاص داده بود. در حالی که در این گونه

This page was created using **Nitro PDF** trial software.
To purchase, go to http://www.nitropdf.com/



نمودار ۱- پراکندگی گونه انگل در مبتلایان به لیشمانیازیس جلدی به تفکیک مراکز بهداشت در شهرستان سبزوار

جدول۳ - میزان انگل موجود در لامهای تهیه شده از مبتلایان به بیماری سالک به تفکیک گونه در شهرستان سبزوار

نتیجه لام مستقیم	تروپیکا		ماژور		جمع	
	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد
Rare	۰	۰/۰	۸	۹/۴	۸	۹/۴
Few	۴	۴/۶	۲۷	۳۱/۴	۳۱	۳۶/۰
Moderate	۱۱	۱۳	۱۹	۲۲/۰	۳۰	۳۵/۰
Severe	۱۷	۱۹/۶	۰	۰/۰	۱۷	۱۹/۶

هیچکدام از مبتلایان دارای لام Rare نبودند. در لامهای بیماران مبتلا به انگل لیشمانیا ماژور، لامهای با تعداد انگل کم با ۳۱/۴ درصد بیشترین نمونه ها را دارا بود، ضمن اینکه هیچگونه لام با تعداد انگل زیاد در این گونه مشاهده نگردید. ارتباط بین میزان انگل موجود در لامهای تهیه شده از مبتلایان و گونه انگل معنی دار بود ($p<۰/۰۵$) (جدول۳).

بیشترین تعداد بیماران مربوط به بخش حکم آباد با ۵۴ بیمار و کمترین تعداد مربوط به بخش روداب با تعداد یک نمونه بود. بیشترین تعداد نمونه انگل لیشمانیا تروپیکا مربوط به شهر سبزوار با تعداد ۱۲ نمونه و در مورد انگل لیشمانیا ماژور مربوط به بخش حکم آباد با تعداد ۴۳ نمونه بود. بین محل سکونت بیماران و گونه انگل ارتباط معنی داری وجود دارد ($p<۰/۰۵$) (نمودار۱).

در مبتلایان به انگل لیشمانیا تروپیکا بیشترین بیمار ساکن میدان بیضی با تعداد ۶ نمونه و کمترین نمونه ساکن خیابان طراع و محله یحیی آباد شامگان و صالح آباد زیر شهر هر کدام با یک نمونه بودند. ضمن اینکه هیچ گونه بیمارآلوده به لیشمانیا ماژور در شهر سبزوار مشاهده نشد.

بحث

تا قبل از پیدایش روشهای جدید، شناسایی و تفکیک گونه های انگل با مشکلات زیادی توام بوده و از راههای پیچیده ای برای این منظور استفاده می گردید: 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 می رفتند (۱۱). ایجاد شیوه های بیوشیمیایی و استفاده از ویژگی های ایزوآنزیمی تا حدی توانست مشکلات شناسایی گونه های لیشمانیا را مرتفع سازد اما اشکالاتی از قبیل کشت انبوه انگل، نیاز به تعدد سیستم آنزیمی، مهارت ویژه و عدم امکان شناخت انگل از ارزش این روش می کاست (۱۲).

اما امروز با شناخت ژنها و استفاده از روشهای تشخیصی مولکولی مشکلات روش های فوق دیگر مشاهده نمی شود و با استفاده از DNA موجودات ، می توان به راحتی گونه انگل را تعیین کرد. روشهای مختلف PCR بدین منظور استفاده می شود (۱۳). ازمجموع ۸۶ نمونهٔ جمع آوری شده از بیماران مبتلا به لیشمانیازیس جلدی درشهرستان سبزوار تعداد ۳۲ نمونه لیشمانیا تروپیکا و ۵۴ نمونه لیشمانیا ماژور تشخیص داده شدند. در این مطالعه ۳۹/۴ درصد از بیماران را جنس مذکر و ۶۰/۶ درصد را جنس مونث تشکیل می دادند. در مطالعات انجام شده توسط

This page was created using **Nitro PDF** trial software.
To purchase, go to http://www.nitropdf.com/

الهی در سال ۱۳۸۶، مهاجری در سال ۱۳۸۰، فتی در سال ۱۳۸۰ در شهر مشهد و مهاجری در سال ۱۳۸۵ در نیشابور نیز به مانند این مطالعه تفاوت معنی داری بین میزان ابتلا به لیشمانیازیس جلدی در دو جنس مشاهده نشد (۱۴- ۱۷).

در بررسی رده های سنی مختلف، رده سنی ۱۱-۲۰ سال با تعداد ۱۹ نمونه بیشترین و افرادی با سن کمتر از یک سال با یک نمونه کمترین تعداد بیمار را به خود اختصاص داده بودند. در این مورد نیز تفاوت معنی داری مشاهده نشد.

اگرچه ضایعات لیشمانیازیس جلدی در هر قسمتی از بدن ممکن است مشاهده شود، اما در این مطالعه در ۷۱/۳ درصد بیماران تنها یک عضو مبتلا شده بود که در این بین دست با ۴۶ درصد بیشترین بیمار و تنه با ۱/۱ درصد کمترین بیمار را به خود اختصاص داده بود. این نتایج با مطالعات مهاجری در سال ۱۳۸۰ در شهر مشهد، متولی امامی و همکارانش در اصفهان در سالهای ۷۵-۷۹، صیادجو و همکاران در سال ۱۳۸۰ در سمنان، فتی در سالهای ۱۳۸۰و ۱۳۸۱ در مشهد، مهاجری در سال ۱۳۸۳ در مشهد و مهاجری در سال ۱۳۸۵در نیشابور که بیشترین میزان آلودگی مربوط به دست گزارش شده است، مطابقت داشت (۷، ۱۵-۱۹). علاوه بر ابتلاء یک عضو، ابتلاء به دو، سه و چهار عضو نیز مشاهده گردید. در مطالعات قبلی تعداد ضایعات در بیماران اغلب یکی بوده است، اما در مطالعات اخیر مشاهده می شود که تعداد افرادی که بیش از یک زخم داشته اند رو به افزایش است (۱،۲،۴،۶،۱۶،۱۸،۲۰-۲۲). این نکته می تواند موید تغییرعادت خونخواری در پشه خاکی ها باشد. در این مطالعه نیز ۳۷ بیمار که دارای یک زخم بودند (۴۳٪) مشاهده شدند در حالی که ۴۹ بیمار(۵۷٪) دیگر بیش از یک زخم داشتند.

در بررسی میانگین اندازه زخم های مبتلایان در دو گونه لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا ماژور بیشترین نمونه مربوط به زخم هایی با میانگین ۱۱ تا ۲۰ میلی متر و کمترین آن مربوط به زخم هایی با اندازه بیشتر از ۴۰ میلی متر بوده است. با استفاده از تست مربع کای مشخص شد ارتباط معنی داری بین اندازه زخم ها و گونه انگل وجود دارد ($p< ۰/۰۵$).

در بررسی نوع زخمهای بیماران در مقایسه بین دو گونه در لیشمانیا تروپیکا نوع خشک با داشتن ۲۲ مورد بیشترین نمونه را به خود اختصاص داده اند، در حالی که در لیشمانیا ماژور بیشترین نمونه مربوط به نوع ترشح دار بود . ضمنا ۸ مورد از بیماران هر دو نوع زخم را در بدن خود داشتند. با استفاده از تست مربع کای مشخص شد ارتباط معنی داری بین نوع زخمها و گونه انگل وجود دارد ($p< ۰/۰۵$).

در بررسی زمان بروز زخم ها در بیمارانی که مبتلا به گونه لیشمانیا تروپیکا بوده اند بیشترین نمونه ها، در فصل بهار با ۱۲ نمونه و کمترین نمونه ها، در فصل زمستان با ۴ نمونه بود. در بیماران مبتلا به گونه لیشمانیا ماژور بیشترین نمونه مربوط به فصل تابستان با ۳۸ نمونه و کمترین نمونه مربوط به فصل زمستان با ۱مورد بود. با استفاده از تست مربع کای مشخص شد ارتباط معنی داری بین زمان بروز زخم ها و گونه انگل وجود دارد ($p< ۰/۰۵$). تعداد انگلها در لامهای برداشت شده از زخم بیماران که با گیمسا رنگ آمیزی شده بودند با توجه به گونه انگل متفاوت بودند. در لامهای تهیه شده از بیماران آلوده به لیشمانیا تروپیکا لامهای با تعداد انگل زیاد(Severe) با ۱۷ نمونه(۵۳٪) بیشترین مورد را دارا بودند در حالی که لامهای نادر(Rare)کمترین موارد را به خود اختصاص داده بود. در لامهای تهیه شده از بیماران آلوده به لیشمانیا ماژور بیشترین نمونه اختصاص به لامهای تعداد انگل کم (Few) داشته ضمن اینکه لامهای تعداد انگل زیاد(Severe) هرگز در این گونه مشاهده نشد. با استفاده از آزمون مربع کای مشخص شد ارتباط معنی داری بین گونه انگل و تعداد انگلها در لامهای رنگ آمیزی شده وجود دارد ($p< ۰/۰۵$)، به طوری که لامهای با تعداد انگل زیاد بیشتر در زخم بیماران آلوده به گونه لیشمانیا تروپیکا و لامهای با تعداد کم انگل بیشتر در زخم بیماران آلوده به گونه لیشمانیا ماژور مشاهده شد.

در بررسی محل سکونت بیماران به تفکیک بخش یا مراکز بهداشت بیشترین بیمار در بخش حکم آباد با تعداد ۵۴ نمونه(۶۳٪) و کمترین مربوط به بخش روداب با یک نمونه بود. شهرستان سبزوار را می توان بر اساس یافته های به دست آمده از لحاظ گونه انگل لیشمانیا به دو کانون تقسیم نمود: کانونی که در آنجا فقط لیشمانیا تروپیکا مشاهده می شود شامل؛ شهر سبزوار و روداب و کانونی که در آنجا هر دو گونه انگل یعنی لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا ماژور یافت می شوند شامل؛ حکم آباد، قزالغارشی، جغتای، ریواده و محمد آباد.

This page was created using **Nitro PDF** trial software.
To purchase, go to http://www.nitropdf.com/

نتیجه گیری

با توجه به اطلاعات موجود شهرستان سبزوار را از لحاظ آلودگی به لیشمانیا می توان به دو کانون خشک و خشک- مرطوب تقسیم نمود. لذا بر خلاف اطلاعات موجود شهرستان سبزوار را دیگر نمی توان تنها به عنوان یک کانون خشک معرفی نمود و این شهرستان دارای هر دو فرم بیماری می باشد . این تغییر اپیدمیولوژی می تواند ناشی از، ساخت و سازهای بی رویه در شهرها و روستاها، انباشته شدن نخاله های ساختمانی و زباله ها در نزدیکی مساکن که باعث رشد مخازن در نوع لیشمانیا ماژور و همچنین ناقلین در هر دو گونه می شود، کشاورزی در محل کونت که زمینه رشد مخازن و ناقلین انگل را مهیا می کند، تغییر شیوه زندگی افراد و تغییرات اکولوژیکی باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت معاونین محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد و دانشگاه علوم پزشکی سبزوار که عهده دار تمامی هزینه های طرح بوده اند انجام پذیرفته است، که بدین وسیله از تمامی کمک های مادی و معنوی این معاونت ها در طول اجرای طرح تقدیر و تشکر می شود. همچنین از ریاست محترم مرکز بهداشت شهرستان سبزوار و پرسنل این مرکز به دلیل مساعدت های اجرایی و عملی قدردانی می شود.

References

1- Jamal khan SH, Muneeb S. Coetaneous leishmaniasis in Pakestan. Dermatol online J 2005; 11:4.
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. Acta trop 1995; 253:199-207.
6- Ardahani S. Leishmania Parasite and Leishmaniasis. Tehran:Nashre Daneshgahi;1994.p.45-47. (in Persian)
7- Mohajery M, Tavakol Afshari J, Mahmoudi MR, Shakri MT, Yazdanpanah MJ. Detecting leishmaniais agents using PCR method. 5th. Iranian Parasitology congress abstract book. Shahid Beheshti University 2005. (in Persian)
8- Sabzevar Medical University.Health centers manual.Sabzevar: Sabzeval Medical University; 2008. p.7-13. (in Persian)
9- Asayesh H. Principals of local programming. Shahrerey: Azad University Publications; 2003.p. 35. (in Persian)
10- Mahboudi F, Abolhassan M, Yaran M, Mobtaker H, Azizi M. Identification and differentiation of Iranian Leishmania species by PCR amplification of kDNA. Scand J Infect Dis 2001; 33:596-598.
11- Mauricio IL, Howard MK, Stothard JR, Miles MA. Genomic diversity in the Leishmania donovani complex. J Parasitol 1999; 119:237-246.
12- Hatam GR. Different laboratory methods for the isolation and detection of leishmaniasis. Shiraz: Shiraz University of Medical Sciences; 2005.(in Persian)
13- Larry SR, John J. Foundations of parasitology. 7th ed. New York: Mc Graw Hill; 2005.
14- Elahi R, Fata A, Berengi F. Comparing different leishmaniasis laboratory detecting methods. Mashhad J Med Sci 1995; 47:68-72. (in Persian)
15- Mohajery M, Boloursaz M, Shamsian AA. Evaluation of cutaneous leishmaniasis among students in Mashhad. Mashhad J Med Sci 2001; 44:54-60. (in Persian)
16- Javidi Z, Fata A. Elahi R, Berenji F, Abbasi E, Mousavi A. Evaluation of factors affecting leishmaniasis progression among 3250 patients referred to Imam Reza Hospital. Mashhad J Med Sci 2005; 44:111-118. (in Persian)
17- Mohajery M, Hajaran H, Shamsian AA, Tavakol Afshari J, Sadabadi F. Detecting leishmaniasis agents in Neishabour Using RAPD-PCR technique. Mashhad J Med Sci 2008; 51:74-86. (in Persian)
18- Motavali Emami M. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis among patients referred to Isfahan dermatology and leishmaniasis clinic during 1996-2000. Cutaneous leishmaniasis new insights congress abstract book 2003; 118. (in Persian)
19- Belding DL. Text book of parasitology. 3rd ed. New York: Meredith publishing; 1965.
20- Cuervo P, Cupplillo E, Nehme N, Hernandez V, Saravia N, Fernandes O. Leishmania(viannia): genetic analysis of cutaneous and mucosal strains isolated from the same patient. Exp Parasitol 2004; 108:59-66.
21- Dehghani MH. Evaluation of cutaneous leishmaniasis incidence among students of Ahmadabad and Torkabad villages in Yazd during 1998. Cutaneous leishmaniasis new insights congress abstract book 2003; 93. (in Persian)
22- Mohajery M, Mokhtari M, Fata A, Shamsian AA. Cutaneous leishmaniasis among patients referred to Qaem Hospital during 1982- 2001. Iran J Med Basic Sci 2006; 9:187-192. (in Persian).

This page was created using **Nitro PDF** trial software.
To purchase, go to http://www.nitropdf.com/