Medical Journal of Mashhad
University of Medical Sciences
Vol.51, No: 100, P: 79 - 86
Summer 2008

مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
شماره ۱۰۰، سال ۵۱
تابستان ۸۷ ، صفحه: ۷۹ - ۸۶

مقاله اصلی

شناسایی گونه های عامل لیشمانیوز پوستی به روش RAPD-PCR در شهرستان نیشابور

***مسعود مهاجری[۱] MD، هما حجاران[۲] MD، سید علی اکبر شمسیان[۳] MD، جلیل توکل افشاری[۴] PhD، فاطمه سعدآبادی[۵] Msc**

[۱]دانشیار انگل شناسی، [۲]استادیار گروه انگل شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران، [۳]استادیار گروه انگل شناسی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، [۴]دانشیار گروه ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، [۵]کارشناس ارشد انگل شناسی پزشکی

تاریخ دریافت: ۸۶/۱۰/۲۰ - تاریخ پذیرش: ۸۷/۳/۲۷

خلاصه

مقدمه: لیشمانیوز به ویژه از نوع جلدی به صورت یک مشکل مهم بهداشتی در بسیاری از نقاط ایران از جمله شهر نیشابور در استان خراسان رضوی مطرح می‌باشد. گونه‌های متفاوتی از این انگل سبب ایجاد بیماری شده و تعیین گونه‌های آن جهت کنترل و پیشگیری از بیماری لازم است. از طرفی تمام گونه‌ها و سویه‌های متعلق به جنس لیشمانیا از نظر مورفولوژیک یکسان هستند و تشخیص گونه‌های عامل سالک به صورت میکروسکوپی امکان پذیر نبوده و یافته‌های اپیدمیولوژیک و بالینی هم به تنهایی ابزار مناسبی برای تعیین گونه انگل نمی‌باشد. اما از آنجا که DNA موجود در هر انگل مانند سایر موجودات زنده خاص همان گونه است، این امر راه را برای استفاده وسیع از DNA جهت شناسایی و تشخیص و تعیین گونه‌های انگل هموار نموده است. در میان این روشها، روش RAPD-PCR از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. از آنجا که شهر نیشابور از کانونهای مهم این بیماری محسوب می‌شود و تاکنون نیز مطالعات دقیق ملکولی درباره وضعیت لیشمانیوز پوستی در این شهرستان صورت نگرفته است، هدف از این مطالعه تعیین گونه‌های انگل ایجاد کننده سالک با روش RAPD-PCR است.

روش کار: این مطالعه توصیفی بر ۵۷ نمونه انگلی جدا شده از افراد مبتلا که از ۸۵/۶/۱ لغایت ۸۶/۵/۳۰ به آزمایشگاههای مراکز بهداشت شهرستان نیشابور مراجعه کرده بودند، انجام شد. جهت تعیین گونه انگل به روش RAPD-PCR نمونه‌های به دست آمده از ۵۷ بیمار مبتلا به لیشمانیوز جلدی که به روش لام مستقیم بیماری آنها تأیید شده بود، در محیطهای NNN و سپس RPMI-1640 کشت داده شدند. پس از کشت انبوه و استخراج DNA به روش پروتئین‌کیناز، نمونه‌ها با روش RAPD-PCR با استفاده از چهار پرایمر ده نوکلئوتیدی تکثیر گردیدند. الگوی الکتروفورزی هر نمونه با نمونه‌های استاندارد لیشمانیا تروپیکا، ماژور و مارکر مقایسه شد و نتایج جمع‌آوری گردید. در این مطالعه نمونه گیری به صورت آسان بود.

نتایج: نتایج این مطالعه نشان داد گونه مولد لیشمانیوز در تمامی ۵۷ بیمار مورد آزمایش در شهرستان نیشابور، لیشمانیا تروپیکا بوده است.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد گونه لیشمانیا تروپیکا تنها عامل ایجادکننده سالک در این شهرستان باشد و همچنین روش RAPD-PCR تکنیک مناسبی جهت شناسایی انگل لیشمانیا در مطالعات اپیدمیولوژیک است.

کلمات کلیدی: لیشمانیا ماژور، لیشمانیا تروپیکا، RAPD-PCR، خراسان، نیشابور

*مشهد - بیمارستان قائم (عج)، گروه انگل شناسی - نویسنده رابط
تلفن: ۸۴۰۳۱۴۱ - ۰۵۱۱، email:Mohajery83@yahoo.com

مقدمه

لیشمانیوز یک بیماری عفونی مشترک بین انسان و حیوان است که عامل آن گونه های مختلف جنس لیشمانیا می‌باشد (۱). طبق آمارهای سازمان بهداشت جهانی WHO/TDR تعداد موارد لیشمانیوز موجود در دنیا حدود ۱۲ میلیون نفر است و تعداد افراد در معرض خطر ۳۵۰ میلیون تخمین زده شده است (۲).

لیشمانیازیس در ۸۸ کشور (در ۵ قاره آفریقا، آسیا، اروپا، شمال و جنوب آمریکا)، ۱۶ کشور پیشرفته و ۷۲ کشور در حال پیشرفت مشاهده گردیده است (۱).

شکل پوستی لیشمانیوز از انواع دیگر شایع تر است. بررسی ها نشان می دهد تعداد نمونه های لیشمانیازیس در جهان در حال افزایش است که علت اصلی این امر تغییرات محیطی ایجاد شده توسط انسان می‌باشد، از جمله این تغییرات می توان به مهاجرتهای بی‌رویه از مناطق روستایی به شهرها ساخت و سازهای بی‌رویه در شهرها و تجمع نخاله‌های ساختمانی و زباله‌های خانگی در حاشیه‌ی آن‌ها اشاره نمود که انسان را هر چه بیشتر در معرض گزش پشه خاکی قرار می‌دهد (۱، ۳). راههای پیشگیری و کنترل سالک بسته به گونه عامل بیماری متفاوت است. تمام گونه ها و سویه های متعلق به جنس لیشمانیا از نظر مورفولوژیک یکسان هستند و تشخیص گونه ها ی عامل سالک به صورت میکروسکوپی امکان پذیر نیست (۴).

در گذشته جهت شناسایی و تفکیک گونه های انگل از روشهای قدیمی که مبتنی بر شواهد کلینیکی و اپیدمیولوژیکی بودند، استفاده می گردید که به اندازه کافی کارساز نبودند (۵). ابداع روشهای جدید بیوشیمیایی و سپس ملکولی که می تواند یک موجود را به طور کامل و دقیق شناسایی نماید نظیر روشهای DNA prob، PCR-RFLP[1] و RAPD-PCR[2] موجب شناخت کامل گونه‌های مختلف انگل شده‌اند (۴، ۶).

نیشابور از کانونهای مهم بیماری لیشمانیوز پوستی در استان خراسان است. این شهرستان بعد از شهر مشهد و سبزوار پرجمعیت‌ترین شهر استان می‌باشد.

[1] Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment
[2] Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction

این شهر به دلیل جمعیت زیاد و همچنین قرار گرفتن در موقعیت ارتباطی و طبیعی بسیار مناسب، دارای اهمیت زیادی است (۸). از آنجا که مطالعات انجام شده در شهرستان نیشابور جهت طبقه‌بندی انگل لیشمانیا در گذشته، تنها بر اساس تظاهرات بالینی و اپیدمیولوژیک انجام شده بود و تاکنون نیز مطالعات لازم و کلاسیک درباره‌ی وضعیت لیشمانیوز در این شهر صورت نگرفته است و از طرفی مطالعات ملکولی متعدد در سالهای اخیر در شهر مشهد که از گذشته به عنوان کانون خشک بیماری مطرح بوده، بیانگر وجود هر دو نوع لیشمانیوز پوستی خشک و مرطوب در این شهر می‌باشد، از این رو این مطالعه با هدف بررسی شناخت گونه‌ی انگلهای لیشمانیای موجود در شهر نیشابور با استفاده از روش ملکولی RAPD-PCR انجام شده است (۷).

روش کار

جامعه مورد مطالعه: در این مطالعه توصیفی بیماران مشکوک به لیشمانیوز پوستی که در فاصله زمانی ۸۵/۶/۱ تا ۸۶/۵/۳۰ به آزمایشگاههای مراکز بهداشت شهرستان نیشابور مراجعه کرده بودند مورد بررسی قرار گرفتند، ۵۷ نمونه انگلی جدا شده از افراد مبتلا، پس از تکمیل پرسشنامه واخذ رضایت‌نامه کتبی از بیماران، با استفاده از روش RAPD-PCR تعیین گونه شدند.

حجم نمونه در این تحقیق با لحاظ قراردادن مطالعات قبلی در شهرستان مشهد و میزان شیوع لیشمانیا ماژور در این شهر و با استفاده از فرمول مربوطه ۵۷ نمونه تعیین شد.

در این مطالعه، نمونه‌گیری به صورت غیراحتمالی آسان بود. نمونه‌برداری و تکثیر انگل: در این طرح از بیماران دارای زخمهای مشکوک به ضایعه سالکی که توسط پزشک معالج به آزمایشگاهها و مراکز بهداشت شهرستان نیشابور ارجاع شده بودند، جهت تهیه لام پارازیتولوژیک، نمونه برداری شد. سپس در شرایط استریل از ترشحات حاصل از زخم افرادی که بیماری آنها از روی لام پارازیتولوژیک تأییدشده بود، بر روی محیط NNN[3] کشت گردید. محیط مذکور را در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار داده پس از ۴۸-۷۲ ساعت رشد انگل بررسی و

[3] Novy-Mc Neal Nicaola

سپس جهت تولید انبوه انگل، محیط RPMI-1640 به همراه ۱۰٪ سرم جنین غیر فعال شده مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج DNA از ژنوم: جهت این عمل ابتدا شمارش انگل توسط لام نئوبایر انجام می گرفت.

در صورتی که تعداد انگلها بیش از یک میلیون در هر میلی لیتر بود، اقدام به تخلیص DNA انگلها می‌شد. سلولهای انگلی با سانتریفیوژ در دور g ۳۰۰۰ در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت ده دقیقه رسوب داده شده و یکبار نیز با فسفات سالین سرد (PBS) با pH= ۷/۲ شسته شدند.

سپس رسوب حاصل در ۵۰۰µl بافر لیزکننده‌ی سلولی (50 mM NaCl, 50 mM EDTA, 1% SDS, 50 mM Tris-HCl, PH 8) حل گردید.

پس از آن پروتئیناز K با غلظت نهایی ۱۰۰µg/ml به محلول بالایی اضافه شده و به مدت یک شب در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد انکوبه گردید.

لیزات حاصل بافنل، فنل-کلروفرم (به نسبت یک به یک) و سپس با کلروفرم به تنهایی تخلیص شد و سرانجام توسط اتانول سرد رسوب داده شد، DNA حاصل در آب مقطر حل گردید.

نهایتاً محلول کار با غلظت ده نانوگرم بر میکرولیتر تهیه شد.

روش انجام آزمایش RAPD-PCR: شرایط بهینه جهت انجام آزمایش RAPD-PCR برای هر واکنش ۲۰ میکرولیتری عبارت بود از:

یک میکرولیتر DNA ی ژنومی با غلظت ده نانوگرم بر میکرولیتر، دو میکرولیتر PCR بافر X 10، ۰/۶ میکرولیتر MgC l2 با غلظت 50 mM، ۰/۶ میکرولیتر dNTPs با غلظت 10 µM، یک میکرولیتر پرایمر با غلظت 10 mM، دو میکرولیتر تک پلیمراز با غلظت 0.5 unit/µl و ۱۲/۸ µl آب مقطر. پارامترهای حرارتی مربوط به ترموسایکلربرای این آزمایش، در ابتدا یک سیکل سه دقیقه‌ای در ۹۴ درجه سانتی گراد (مرحله واسرشت اولیه) بود و سپس سیکل یک دقیقه‌ای در۹۴ درجه سانتی گراد، دو دقیقه‌ای در ۳۷ درجه سانتی گراد و دو دقیقه‌ای در۷۲ درجه سانتی گراد بود که سه مرحله اخیر به تعداد ۴۵ بارتکرار می‌گردید و نهایتاً یک سیکل ۱۰ دقیقه ای در ۷۲ درجه سانتی گراد (مرحله گسترش نهایی) انجام می‌گرفت.

پس از اتمام کار در دستگاه ترموسایکلر ۸ میکرولیتر از محصولات PCR به همراه یک مارکر 100bp بر ژل آگاروز ۱/۲ درصدی، حاوی اتیدیوم بروماید به مدت ۴ ساعت در ۵۰ ولت در بافر TAE ران گردید و عکسهای حاصل از ژل درون دستگاه ترانس ایلومیناتور تهیه شد.

در این مطالعه از ۴ پرایمر ده نوکلئوتیدی AB1-07، A4 ، ۳۲۷ و ۳۲۹ به عنوان پرایمرهای مطلوب جهت تفکیک گونه‌های لیشمانیا استفاده گردید با استفاده از این پرایمرها بخشهایی از DNA تکثیر شد. توالی این پرایمرها که از شرکت پرایم(Primm) تهیه شده بود در جدول زیر آمده است.

جدول ۱ – توالی پرایمرهای به کار رفته در مطالعه

توالی (3-5)	نام پرایمر
GGTGACGCAG	AB1-07
ATACGGCGTC	327
AATCGGGCTG	A4
GCGAACCTCC	329

سپس باندهای ایجاد شده توسط نمونه‌ها با باندهای ایجاد شده توسط نمونه‌های استاندارد و مارکر مقایسه شده و نتایج جمع‌آوری گردید. دو گونه استاندارد مورد استفاده که از دا نشکده بهداشت دانشگاه تهران تهیه شده بود، شامل لیشمانیا ماژور (MHOM/IR/75/ER) و لیشمانیا تروپیکا (MHOM/IR/99) بودند.

نتایج

بیماران شرکت کننده در این مطالعه از مناطق شهری و بخشهای تابعه شهرستان نیشابور انتخاب شدند. این افراد دارای سنین ۲ سال تا ۶۶ سال و میانگین سنی ۳۲ سال بودند.

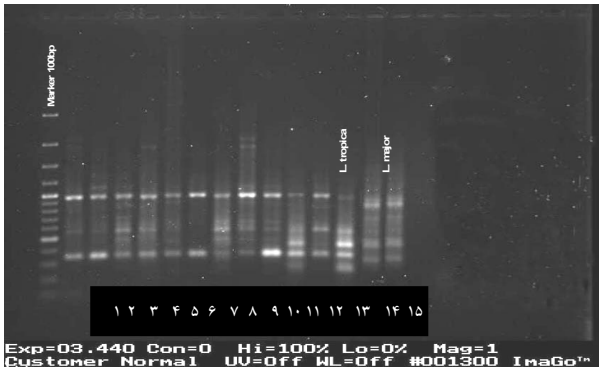
از ۵۷ بیمار مبتلا به لیشمانیوز پوستی شرکت کننده در این مطالعه ۲۵ نفر مؤنث و ۳۷ نفر مذکر بودند. در این بررسی، زخمهای سالکی، در بین مبتلایان به لیشمانیوز در اندامهای

مختلف بدن مشاهده گردید و بیشترین محل ضایعه مربوط به ناحیه‌ی دست و کمترین محل ضایعه در ناحیه‌ی تنه دیده شد. در این مطالعه ۴۵ نفر دارای یک ضایعه، ۹ نفر دارای دو ضایعه، ۳ نفر دارای سه ضایعه، ۱ نفر دارای چهار ضایعه و ۲ نفر دارای ۶ زخم بودند. هر یک از پرایمرهای مذکور با DNA انگل، یک یا چند باند در الکتروفورز ایجاد می‌کنند که می‌توانند به عنوان معیار در مقایسه با سوشهای استاندارد و باندهای مارکر، جهت تشخیص گونه‌های لیشمانیا به کار روند. تعداد باندهای حاصل در هر نژاد[1] متغیر بوده و سایز باندهای آن در این مطالعه بین ۲۵۰ تا ۲۵۰۰ جفت باز[2] بود.

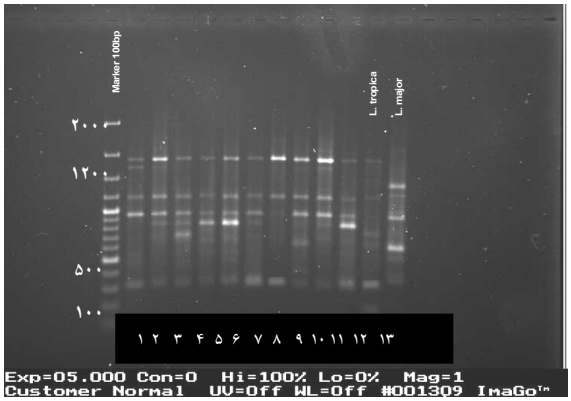
این نکته قابل ذکر است که وجود باندهای ثابت در موقعیتهای یکسان الکتروفورز برای غلظتهای یکسان از نمونه‌های DNA در تفسیر نتایج آزمایش RAPD-PCR ارزشمند است. دو باند اصلی DNA در لیشمانیا تروپیکا با پرایمر AB1-07 مشاهده شد. محدوده‌ی تقریبی این دو باند حدود ۹۵۰ و ۳۵۰ جفت باز بود. برای لیشمانیا ماژور سه باند در حدود ۸۵۰، ۴۵۰ و ۳۰۰ جفت باز، با این پرایمر شناسایی گردید (شکل ۱).

در پرایمر ۳۲۷، چهار باند اصلی برای لیشمانیا تروپیکا مشاهده شد که اندازه تقریبی آن ۱۹۰۰، ۱۲۰۰، ۹۵۰ و ۳۵۰ جفت باز بود. برای لیشمانیا ماژور هم با این پرایمر سه باند با اندازه‌های حدود ۱۴۰۰، ۱۰۰۰ و ۶۰۰ جفت باز دیده شد (شکل ۲). برای پرایمر ۳۲۹ در گونه‌ی لیشمانیا تروپیکا دو باند با اندازه‌ی تقریبی ۸۵۰ و ۴۵۰ جفت باز وبرای لیشمانیا ماژور دو باند در حدود ۷۵۰ و ۶۵۰ جفت باز شناسایی گردید (شکل۳).

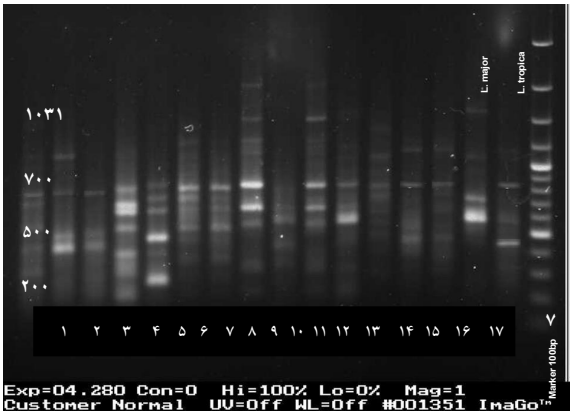
در پرایمر A4 نیز سه باند اصلی برای لیشمانیا تروپیکا با اندازه‌ی تقریبی ۷۰۰، ۵۵۰ و ۲۵۰ جفت باز و برای لیشمانیا ماژور سه باند در حدود ۱۳۵۰، ۸۵۰ و ۲۰۰ جفت باز مشاهده شد (شکل۴). از ۵۷ نمونه‌ی جمع‌آوری شده از بیماران مبتلا به لیشمانیوز پوستی درشهرستان نیشابورکه در این مطالعه به روش RAPD-PCR تعیین گونه گردیدند، همگی لیشمانیا تروپیکا تشخیص داده شدند.



شکل ۱- الگوی باندی به دست آمده از واکنش RAPD-PCR با پرایمر AB1-07، چاهک ۱ مارکر با سایز100bp، چاهک ۲ تا ۱۲ نمونه های بیماران، چاهک۱۳ استاندارد لیشمانیاتروپیکا و چاهک ۱۴ و ۱۵ استاندارد لیشمانیا ماژور می‌باشد

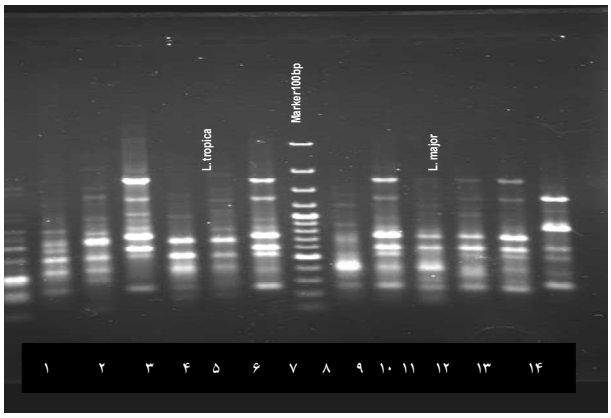


شکل ۲ – الگوی باندی به دست آمده از واکنش RAPD-PCR با پرایمر ۳۲۷، چاهک ۱ مارکر باسایز100bp، چاهک ۲ تا ۱۱ نمونه های بیماران، چاهک۱۲ استاندارد لیشمانیا تروپیکا و چاهک ۱۳ استاندارد لیشمانیا ماژورمی باشد.



شکل ۳ – الگوی باندی به دست آمده از واکنش RAPD-PCR با پرایمر ۳۲۹، چاهک ۱۷ مارکر با سایز100bp، چاهک ۱ تا ۱۴ نمونه های بیماران، چاهک۱۵ استاندارد لیشمانیا ماژور و چاهک ۱۶ استاندارد لیشمانیا تروپیکا می‌باشد.

[1] Strain
[2] Base pair



شکل ٤ – الگوی باندی به دست آمده از واکنش RAPD-PCR با پرایمر A4، چاهک ۸ مارکر با سایز100bp، چاهک ۱، ۲، ۳، ۵، ۶، ۷، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۳ نمونه های بیماران، چاهک ۴ استاندارد لیشمانیا تروپیکا و چاهک ۱۴ استاندارد لیشمانیا ماژورمی‌باشد.

بحث

بیماری لیشمانیوز از سوی سازمان بهداشت جهانی به عنوان یکی از شش بیماری مهم عفونی دنیا معرفی شده و تمرکز تحقیقات پیرامون جنبه های مختلف آن توصیه و مورد تأکید قرار گرفته است(۹). بررسی ها نشان می دهد تعداد نمونه های لیشمانیازیس در جهان در حال افزایش است که علت اصلی این امر تغییرات محیطی ایجاد شده توسط انسان می باشد (۲).

لیشمانیوز خصوصاً نوع جلدی آن به صورت یک مشکل مهم بهداشتی در کشور ما مطرح بوده و دارای پراکندگی وسیعی است. طبق تحقیقات انجام شده در گذشته، در استان خراسان نیز هر دو فرم لیشمانیوز جلدی خشک و مرطوب نیز گزارش شده است. فرم خشک در شهرهای مشهد، نیشابور، سبزوار و ... و فرم مرطوب در شهرهای سرخس، لطف‌آباد و اسفراین دیده شده است (۱۱،۱۰).

نیشابور از کانونهای مهم سالک شهری است. این شهرستان یکی از مهمترین و پرجمعیت‌ترین شهرهای استان خراسان رضوی است (۷). در سالهای گذشته افزایش جمعیت، توسعه‌ی صنعتی و کشاورزی شهرستان، مهاجرت عده‌ی زیادی از افراد غیرایمن از روستاها و شهرهای اطراف و سکونت در منطقه‌ای که شرایط پرورش و تکثیر پشه خاکی از هر جهت فراهم بوده است، احداث واحدهای مسکونی پراکنده و وجود زمینهای بایر در بین مناطق مسکونی و تشکیل بافت نیمه روستایی در حاشیه‌ی شهر، شرایط مناسبی را جهت استقرار بیماری در این ناحیه فراهم آورده است (۳). به طوری که میزان شیوع بیماری در سالهای اخیر علی رغم برنامه‌های کنترل و پیشگیری کاهش چندانی نیافته و حتی بنا به گزارشات مرکز بهداشت شهرستان، شاهد افزایش نسبی میزان شیوع بیماری در این شهر در چند سال اخیر بوده‌ایم. به همین دلیل تعیین گونه‌های لیشمانیا جهت برنامه‌ریزیهای مناسب در این شهرستان با روشهای دقیق ملکولی ضروری می نمود. در سالهای اخیر مطالعات دقیقی در این زمینه در کشور صورت گرفته است.

حمزوی و همکاران در سالهای ۱۹۹۹- ۱۹۹۸ مطالعه‌ای را به منظور شناسایی و تعیین ویژگیهای اپیدمیولوژیک بیماری سالک در شهرستانهای دشتی و دشتستان بر بیماران مبتلا و همچنین مخازن حیوانی، با استفاده از روش RAPD-PCR انجام دادند. نتایج حاصله نشانگر این موضوع بود که لیشمانیوز جلدی در کانونهای مورد مطالعه از نوع روستایی بوده و جهت کنترل بیماری باید از شیوه‌های مطرح شده در کنترل لیشمانیوز روستایی استفاده نمود (۱۲). یعقوبی ارشادی و همکاران در مطالعه‌ای در طی سال ۲۰۰۲ در شهرستان اردکان، واقع در استان یزد با روش RAPD-PCR، به تعیین گونه انگل پرداختند و مشاهده کردند که لیشمانیوز پوستی روستایی یک بیماری آندمیک در این منطقه است و لیشمانیا ماژور عامل آن می‌باشد (۱۳).

همچنین نتایج مطالعه‌ای که معتضدیان و همکاران در سال ۲۰۰۲ به منظورتعیین گونه‌های مولد لیشمانیوز پوستی در تعدادی از استانهای کشور انجام دادند حاکی از آن بود که تغییراتی در اپیدمیولوژی بیماری سالک در کشور پدید آمده است. در گذشته این بیماری در نقاط خاصی متمرکز بوده است، اما در حال حاضر یکی از شایع‌ترین بیماریهای انگلی بوده و به صورت یک مشکل بزرگ بهداشتی در کشور درآمده است.

ظهور بیماری از اغلب بخشهای مرکزی، جنوبی و شرقی کشور گزارش شده است. در این مناطق عوامل جغرافیایی و طبیعی، شرایط اقلیمی، توسعه‌ی بخش کشاورزی و همچنین مهاجرت افراد از کشورهای همسایه همچون افغانستان شرایط مناسبی را جهت انتشار بیماری فراهم آورده است (۱۴).

در استان خراسان مطالعاتی که در گذشته جهت طبقه بندی انگل لیشمانیا صورت گرفته بود به صورت ابتدایی و بر اساس تظاهرات بالینی و اپیدمیولوژیک انجام شده بود و اطلاعات دقیق در مورد نوع انگل منطقه وجود نداشت (۳). در چند سال اخیر مطالعات مختلفی در شهر مشهد بر بیماران سالکی انجام شده است. مهاجری و همکاران در سال ۱۳۷۸ به روش آنزیم الکتروفورزیس به تعیین گونه انگل پرداختند. در این مطالعه گونه های عامل لیشمانیوز در شهر مشهد مورد بررسی قرار گرفت و بر خلاف مطالعات گذشته لیشمانیا ماژور هم یافت گردید (۳). ولی‌زاده و همکاران در سال ۱۳۸۲ به روش مونوکلونال آنتی بادی گونه های مولد سالک را در شهر مشهد مورد مطالعه قرار دارند. در این مطالعه هم علاوه بر لیشمانیا تروپیکا، لیشمانیا ماژور در مشهد مشاهده گردید که تأییدی بر مطالعه‌ی قبلی بود (۱۵). حجاران و همکاران در فاصله سال های ۸۱ تا ۸۳، ۸۷ نمونه انگلی را از بیماران سالکی مراجعه کننده به مراکز بهداشت شهر مشهد جمع آوری کردند و با روش RAPD-PCR تعیین نمودند. نتایج این تحقیق نشان داد، لیشمانیا تروپیکاگونه غالب مولد لیشمانیوز جلدی در مشهد است اما لیشمانیا ماژور هم در این شهر وجود دارد. این تحقیق تغییر سیمای اپیدمیولوژیک بیماری سالک را در شهر مشهد نشان داد (۱۶).

محمودی نیز در سال ۱۳۸۳ در شهر مشهد به تفکیک گونه های مولد لیشمانیوز به روش PCR پرداخت. وی در میان نمونه های انگلی مربوط به بیماران سالکی لیشمانیا ماژور نیز تشخیص داد. لذا ثابت گردید که در شهر مشهد علاوه بر لیشمانیا تروپیکا لیشمانیا ماژور هم وجود دارد (۴).

در این طرح از روش RAPD-PCR جهت تعیین گونه‌های لیشمانیا استفاده شد. یکی از مزایای عمده‌ی این روش عدم نیاز به اطلاعات اولیه در مورد ردیف DNA جهت طراحی و ساخت آغازگرها می‌باشد. به طوری که یک آغازگر چند نوکلئوتیدی را می‌توان در مورد هر گونه یا موجود به کار برد. از دیگر مزایای آن می‌توان به هزینه کم و سرعت تولید و اجرای آن اشاره کرد. امکان بررسی چندین لوکوس در ژنوم نمونه‌ها، نامحدود بودن تعداد نشانگرها، نیاز به مقدار کم DNA، سادگی و سرعت این تکنیک آن را به روشی مطلوب تبدیل نموده است. البته این تکنیک برای نمونه‌های کلینیکی به طور مستقیم قابل استفاده نبوده و نمونه مورد نظر باید کشت و انبوه‌سازی شود (۱۷).

در این مطالعه پس از استاندارد کردن روش RAPD-PCR از ۴ پرایمر ده نوکلئوتیدی AB1-07، A4، ۳۲۷ و ۳۲۹ که در مقالات مختلف به کار برده شده بود، به عنوان پرایمرهای مطلوب جهت تفکیک گونه‌های لیشمانیا استفاده گردید (۱۹،۱۸،۱۶). با استفاده از این پرایمرها بخشهایی از DNA تکثیر شد (۲۰).

با توجه به این آزمایشات به نظر رسید، پرایمرهای مذکور برای تفکیک گونه‌های لیشمانیا مناسبند، اما پرایمر AB1-07 با داشتن الگوی باندی کاملاً مشخص و یکنواخت به طور اختصاصی‌تر می‌تواند جهت تفکیک گونه‌های لیشمانیا به کار رود.

در این پژوهش بیشتر ۵۷ بیمار مورد مطالعه دارای ۱- ۲ ضایعه بودند و بیشترآنها بیش از دو ماه از زمان ابتلای آنها گذشته بود، از طرفی نتایج آزمایش RAPD-PCR نشان داد تمام نمونه‌های مورد مطالعه لیشمانیا تروپیکا بوده‌اند، با توجه به مطالب فوق این مطالعه موید این موضوع می‌باشدکه لیشمانیا تروپیکا گونه‌ی مولد لیشمانیوز پوستی در شهرستان نیشابور است و بر خلاف شهر مشهد که در سالهای اخیر علاوه بر گونه لیشمانیا تروپیکا (گونه غالب مولد سالک در این شهر) لیشمانیا ماژور هم در آن دیده شده است (۱۶،۱۵،۴،۳)، اما شهرستان نیشابور علی رغم مجاورت با شهر مشهد هنوز حالت بکر و دست نخورده‌ی خود را نسبت به بیماری سالک حفظ کرده و به عنوان یکی ازکانونهای خشک بیماری محسوب می‌شود و تغییرات اپیدمیولوژیکی خاصی در زمینه‌ی این بیماری در این شهرستان ایجاد نشده است.

نتیجه گیری

با توجه به مطالعه انجام شده به نظر می‌رسد روش RAPD-PCR روشی مناسب و قابل قبول جهت شناسایی گونه‌های لیشمانیا می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق، با مساعدت معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد که تمامی هزینه‌های این طرح را عهده‌دار شدند انجام گرفت، از تمامی کمکهای مادی و معنوی این معاونت در طول انجام این پژوهش تقدیر و تشکر می گردد. از معاونت بهداشت دانشگاه علوم پزشکی مشهد، آقای دکتر سید منصور حسینیان ریاست محترم مرکز بهداشت شهرستان نیشابور، آقای بادیانی تکنیسین محترم آزمایشگاه بهداشت مرکزی نیشابور و خانم گنجعلی کارشناس محترم آزمایشگاه ایمونوژنتیک پژوهشکده بوعلی مشهد نیز به دلیل مساعدتهای اجرائی و عملی قدردانی می شود.

****

References:

1- Vidyashankar C. Leishmaniasis. 2006. eMedicine. Available at: URL: http://www.eMedicine.com/emerg/topic 296.htm. Accessed at Oct 11, 2006.

2- Jamal khan Sh, Muneeb S. Cutaneous leishmaniasis in Pakistan. Dermatol online J 2005; 11(1):4.

3- Mohajery M, Hatam GhR, Javaheri A. Isolation of Leishmania major by isoenzyme electrophoresis in Mashhad. Medical Journal of Mashhad University of Medical Sciences 2005; 48(88):177-184.

4- Mahmudi MR. Identification of Leishmania species causing cutaneous leishmaniasis by PCR method in Mashhad. Thesis of Medical parasitology Msc, Mashhad University of Medical Sciences 2005.

5- Klaus SN, Frankenburg S, Ingber A. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis. Clin Dermatol 1999May-Jun; 17(3):257-260.

6- Motazedian MH. Application of methods based of genome for identification of Leishmania parasite.In: Hatam GhR, Ardehali S, Motazedian MH, Sajjadi M, Fakoor Ziba MR. The methods of isolation and characterization of Leishmania parasite. Shiraz University of Medical Sciences; 1994.p. 111.

7- Nadim A, Javadian A, Seyedi Dashti MA. Epidemiology of leishmaniasis in Iran. In: Ardehali S, Rezaee HR. Leishmania parasite and leishmaniasis. Daneshgahi publisher; 1994.p. 179.

8- Rahnama MR, Amir Fakhrian M, Tavangar M, Zabihi J, Khosravi M. Identification report of informal habitant in Neyshaboor. Project executive: Mashhad department of Jahade daneshgahi; 2007.

9- Rafati S, Salmanian AH, Hashemi K, Schaff C, Belli S, Fasel N. Identification of leishmania major cystein proteinases as targets of the immune respons in humans.Mol Biochem Parasitol, 2001; 113(1): 35-43.

10- Elahi R, Fata AM, Berenji F. Comparison of laboratory diagnosis methods of leishmaniasis. Medical Journal of Mashhad University of Medical Sciences 1995; Vol.47: 72-76.

11- Saebi A.Clinical parasitology and protozoa diseases in Iran. 4th ed. Hayyan publisher; 2003.p.189.

12- Hamzavi Y, Mohebali M, Edrissian GhH, Foruzani A. An epidemiological study of cutaneous leishmaniasis in Dashtestan and Dashti districts, Bushehr province, Iran (1998-1999). Iran J public health 1379; 4-1(29):190-177.

13- Yaghoobi-Erhadi MR, Jafari R, Hanafi-Bojd AA. A new epidemic focuses of zoonotic cutaneous leishmaniasis in central Iran. Ann Saudi Med. 2004 Mar-Apr; 24(2): 98-101.

14- Motazedian H, Noamanpoor B, Ardehali S.Characterization of leishmania parasites isolated from provinces of the Islamic Republic of Iran. East Mediterr Health J 2002Mar-May; 8(2-3): 338-334.

15- Valizade M, Dalimi Asl A, Fata A, Jafari MR, Khamesipoor A, Mohajeri M. Characterization of Leishmania species causing cutaneous leishmaniasis by especific monoclonal antibodies in Mashhad. Journal of Modarres University of Medical Sciences 2004; 7(2):107-113.

16- Hajjaran H, et al. Identification of leishmania species isolated from human cutaneous leishmaniasis, using random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR). Iranian J Publ Health 2004; 33(4):8-15.
17- Ghareyazi B. Application of DNA markers in plant breeding, Articles of 4th Iranian crop science congress, Esfehan: College of agriculture of Esfehan University of technology 1996: 381-383.
18- Mauricio IL, Howard MK, Stothard JR, Miles MA. Genomic diversity in the Leishmania donovani complex. Parasitology 1999 Sep; 119(Pt3):237-246.
19- Zemanova E, Jirků M, Mauricio IL, Miles MA, Lukes J. Genetic polymorphism within the Leishmania donovani complex: correlation with geographic origin. Am J Trop Med Hyg 2004; 70(6):613-617.
20- Hajjaran H. Isolation of Leishmania parasites in human and animal reservoir from Leishmaniasis endemic zones of northwest and northeast of Iran in order to species identification and characterization of genetic polymorphism by RAPD-PCR molecular method. Thesis of PhD, College of health of Tehran University of Medical Sciences, 2003.