



شناسایی لشمانيوز پوستی با استفاده از روش Multiplex PCR

زهرا صفری^۱، مجتبی سعادتی^{۲*}، شهرام نظریان^۳، محمد هیات^۴، مرتضی میرزایی^۵

۱-۳ کارشناس ارشد سلولی و مولکولی، گروه علوم زیستی دانشگاه امام حسین (ع)

۲- دانشیار میکروب شناسی گروه علوم زیستی، دانشگاه امام حسین (ع)

۴-۵ کارشناس ارشد سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی و محیط زیست، دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج)

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۱۱/۱۵

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۵/۱۴

چکیده

مقدمه: سالیانه بیش از ۱۴ میلیون انسان آلوده به لشمانيوز در سراسر دنیا گزارش می‌شود. این بیماری در ایران به دو شکل پوستی و احشایی وجود دارد که نوع پوستی آن در نقاط مختلف دارای گستردگی بیشتر می‌باشد. در سالهای اخیر استفاده از روش PCR برای تشخیص لشمانيوز پوستی در بیماران در مناطق مختلف جغرافیایی مورد استفاده قرار گرفته است. در این روش از پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر ژن‌های مختلف انگل مانند ژن‌های rRNA ریوزومی، DNA کینتوپلاستی و یا ترتیب‌های تکراری استفاده شده است. هدف از این مطالعه تشخیص سریع لشمانيوز پوستی در مراحل اولیه این بیماری در افراد مبتلا با استفاده از روش Multiplex-PCR است.

روش بررسی: در این مطالعه نمونه‌برداری از زخم ۶۷ بیمار آلوده به لشمانيوز جلدی انجام شد. ابتدا ژنوم انگل با روش فنل-کلروفرم تخلیص شد. با استفاده از روش PCR و پرایمر مناسب، تکثیر DNA مورد نظر صورت پذیرفت. محصول به دست آمده هم‌زمان با محصول DNA تکثیر شده سویه‌های استاندارد، الکتروفورز و پس از مقایسه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. از دو نمونه استاندارد Leishmania. tropica و Leishmania. major به عنوان کنترل مثبت نیز استفاده گردید.

نتایج: طول محصول PCR با پرایمر، AB ۱۱۵ جفت باز و با پرایمر UL، ۶۸۳ جفت باز بود. نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که حساسیت پرایمرهای مختلف برای تشخیص بیماری با توجه به دو گونه عامل بیماری یعنی Leishmania Major و Leishmania Tropica یکسان نبوده و به گونه‌ای که حساسیت روش PCR با پرایمر AB در حد ۳۵ سلول و با پرایمر UL در حد ۴۰ سلول بود.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه دلالت بر حساسیت PCR جهت شناسایی لشمانيوز پوستی دارد و به عنوان استاندارد جدید در شناسایی متداول زمانی که تشخیص گونه نیاز نبوده می‌تواند، مورد استفاده گیرد. هر چند توانایی در تشخیص گونه‌ها در پیش‌بینی بیماری، تصمیم در درمان مناسب و خصوصاً در نواحی که بیش از یک گونه و بیماری بوسیله پزشک مشاهده شود از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: Multiplex-PCR - لشمانيوز جلدی - بیماری‌های پوستی

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۴۸۷۳-۷۷۱-۰۲۱، نمابر: ۰۴۹۸۰-۷۷۱-۰۲۱، پست الکترونیکی: saadati_m@yahoo.com

مقدمه

بیماری لیشمانیوز یکی از بیماری‌های مهم قابل انتقال توسط بندپایان می‌باشد که بعد از مالاریا به عنوان یک معضل بهداشتی در جهان مورد توجه قرار گرفته است (۱). عامل بیماری انگل‌های تک یاخته داخل سلولی از خانواده Trypanosomatidae و جنس *Leishmania* می‌باشد و در ردیف بیماری‌های مشترک انسان و حیوان (زئونوزها) قرار دارد. لیشمانیوز هم اکنون در ۸۸ کشور جهان در سراسر ۵ قاره از حالت اندمیک برخوردار است و در مجموع ۳۵۰ میلیون نفر در معرض ابتلا به این بیماری قرار دارند. از این تعداد، ۲۲ کشور در دنیای جدید و ۶۶ کشور در دنیای قدیم که ۱۶ کشور آن توسعه یافته و ۷۲ کشور در حال توسعه هستند (۲-۴). حدود ۱۴ میلیون نفر به این بیماری مبتلا می‌باشند و سالانه بین ۲-۱/۵ میلیون مورد جدید لیشمانیوز در دنیا رخ می‌دهد. ۹۰ درصد موارد لیشمانیوز جلدی از ۷ کشور افغانستان، الجزایر، برزیل، پرو، ایران، عربستان سعودی و سوریه گزارش شده است (۵-۸). در ایران لیشمانیوز جلدی (خشک و مرطوب) و احشایی از بیماری‌های مهم انگلی می‌باشد که لیشمانیوز جلدی در ایران به دو فرم شهری (خشک) و روستایی (مرطوب) وجود دارد و هر کدام دارای کانون‌های متعددی هستند (۹، ۱۰).

استان یزد از مناطقی است که در سال‌های اخیر با مشکل جدی لیشمانیوز جلدی مواجه بوده، به طوری که در سال‌های ۱۳۷۵ و ۱۳۷۶ از شهر یزد به ترتیب ۲۶۵ مورد و از شهرستان اردکان ۱۸۰ مورد از این بیماری دز مرکز بهداشت استان یزد ثبت شده است. بررسی آمار مبتلایان نشان می‌دهد که این بیماری در حال حاضر در هفت شهرستان از این استان دارای شیوع زیادی می‌باشد و کانون‌های عمده این بیماری در دو شهر یزد و شهرستان اردکان گزارش شده است. طی سال‌های ۸۷-۱۳۸۶ مطالعات جامعی در زمینه اپیدمیولوژی لیشمانیوز پوستی در شهر یزد و شهرستان اردکان بعمل آمد تا بتوان بر اساس اطلاعات بدست آمده برنامه‌ریزی‌های مربوط به کنترل بیماری را طراحی کرد. عامل لیشمانیوز جلدی روستایی در ایران *Leishmania Major* و عامل لیشمانیوز جلدی شهری *Leishmania Tropica* می‌باشد که

بیماری لیشمانیوز جلدی توسط گونه‌های خاصی از پشه خاکی‌های فلیو تومینه منتقل می‌گردد (۱۱، ۱۲). روش‌های مختلفی توسط محققین جهت شناسایی انگل لیشمانیا مورد استفاده قرار گرفته که هر کدام دارای معایب و مزایایی می‌باشد که در این میان روش مولکولی PCR با توجه به دقت و حساسیت آن نظر محقق را به خود معطوف نموده است. این تکنیک در سال‌های اخیر هم برای تشخیص و هم برای تعیین گونه لیشمانیا استفاده شده است (۱۷-۱۳).

هدف این مطالعه تشخیص لیشمانیوز پوستی (سالک) با استفاده از روش Multiplex-PCR بود تا بدین وسیله بتوان در مدت زمان کوتاهی نمونه‌های بیماری که مشکوک به بیماری لیشمانیازیس هستند شناسایی شوند تا بتوان پس از تشخیص سریع نسبت به درمان مبتلایان اقدام نمود.

روش بررسی

آنزیم Taq DNA Polymerase، آنزیم‌های محدودالانتر مارکر 100 bp DNA ladder و Tris-base، EDTA، dNTP، MgCl₂، RNAse، اتیدیوم بروماید از شرکت Roch آلمان تهیه گردید.

در این مطالعه که یک مطالعه مشاهده‌ای و به روش تشخیصی بود، نمونه‌برداری بر روی ۶۷ بیمار آلوده به لیشمانیوز پوستی انجام شد. این تعداد نمونه از بیماران مراجعه کننده به متخصص پوست در زمان شیوع بیماری لیشمانیوز پوستی که مشکوک به سالک و دارای زخم بر روی سطح بدن (دست، پا، صورت و به ندرت کمر) بودند، تهیه شده است. از این نمونه‌ها در انستیتو پاستور تهران، لام مستقیم تهیه و نسبت به کشت آن در محیط N.N.N اقدام گردید. محیط‌های کشت نیز از نظر وجود پروما سیتگوت لیشمانیا مورد بررسی قرار گرفت. برای ایزولاسیون پرولاسیون پروما سیتگوت انگل به محیط کشت RPMI-۱۶۴۰ منتقل و به تعداد زیاد پاساژ داده شد تا افزایش حداکثری در تعداد انگل مشاهده شود. سپس مرحله رسوب گیری از انگل لیشمانیا انجام گرفت.

پس از انتخاب قطعات ژنی مناسب، نسبت به تهیه پرایمرهای

تحت تأثیر ولتاژ ۸۰ الکتروفورز شد.

تأیید محصول توسط آنزیمهای محدود کننده: ابتدا توالی ژنهای مورد نظر از بانک ژنوم استخراج شد. پس از استخراج توالی ژنها و یافتن جایگاه پرایمرها در روی آنها و بدست آوردن اندازه دقیق قطعات تکثیر شده توسط نرم افزار DNASIS، جایگاه برش آنزیمی در روی قطعات مورد بررسی قرار گرفت. پس از اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر، نسبت به برش آنها توسط آنزیم معین شده اقدام شد (پرایمر UL با آنزیم XHOI و پرایمر AB با آنزیم TaqI، mnlI برش داده شدند). پس از انجام واکنش، برای الکتروفورز محصولات برش خورده از ژل آگارز یک درصد استفاده گردید.

تعیین حساسیت واکنش بر حسب تعداد انگل: برای محاسبه حساسیت واکنش بر اساس تعداد انگل، پس از کشت انگل و اندازه گیری OD محیط کشت، ابتدا از محیط مورد نظر تا 10^{-1} رقت تهیه کرده و برای تمامی رقت ها واکنش PCR انجام شد. جهت محاسبه تعداد انگل در هر رقت از لام نئوبار استفاده شد.

تعیین میزان اختصاصی بودن واکنش PCR: برای این منظور، واکنش PCR با ژنوم تخلیص شده از باکتری های کمیلوباکتر ژرونی، استافیلوکوک ارئوس، استرپتوکوک پنومونیه، باسیلوس سرئوس، کلبسیلا پنومونیه انجام شد و محصول واکنش با ژل آگارز دو درصد الکتروفورز شد.

آنالیز آماری: تجزیه و تحلیل آماری جهت تعیین تفاوت های بین دو روش UL و AB با استفاده از آزمون آماری مک نمار (McNemar) انجام گردید که با توجه به این آزمون و سطح معنی داری آن ($P=1$) نشان داده شده که بین دو روش UL و AB در شناسایی نتایج آزمون ها (مثبت و منفی بودن آنها) اختلاف معنی داری مشاهده نشد.

نتایج

انگل لشمانيوز در نمونه های بیماران مشکوک با استفاده از روش های استاندارد آزمایشگاهی (کشت NNN و RPMI 1640)، مشاهده میکروسکوپی) شناسایی شدند. همچنین

اختصاصی برای انگل لشمانيوز اقدام گردید. پرایمرهای مورد نظر، به وسیله نرم افزارهای مولکولی (DNASIS, BLAST, Oligo) جهت وجود لوپ، دمای ذوب و سایر خصوصیات مورد بررسی قرار گرفت. پس از ساخته شدن پرایمرها و قبل از استفاده در واکنش PCR، کیفیت آنها با الکتروفورز بر روی ژل PAGE نیز مورد بررسی قرار گرفت. این پرایمرها عبارتند از:

A: GGG TAG GGG CGT TCT GCG AA (F) (الف)

B: CGC ACT ATT TTA CAC CAA CCC C (R)

U: GGG GTT GGT GTA AAA TAG GCC (F) (ب)

L: CTA GTT TCC CGC CTC CGA G (R)

پرایمر AB قطعه ای به طول ۱۱۵ bp و پرایمر UL قطعه ای به طول ۶۸۳ bp را تکثیر نمود.

استخراج DNA ژنومیک: برای استخراج و تخلیص DNA ژنومیک انگل از روش فنل-کلروفرم استفاده شد. جهت بررسی کیفیت محصول تخلیص شده، DNA ژنومی روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز گردید.

واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR): برای انجام فرآیند Multiplex-PCR، ۱ میکرولیتر از DNA تخلیص شده با غلظت ۱۰۰ ng/μl از ژنوم انگل با ۲۴ میکرولیتر از دیگر اجزا واکنش PCR مخلوط شد. این اجزا عبارتند از: ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (پرایمر AB و پرایمر UL) با غلظت ۱۰ μl/mol p (در مجموع ۲ میکرولیتر)، ۱ میکرولیتر از مخلوط dNTP با غلظت ۱/۵ mM MgCl₂ با غلظت ۲ mM، ۲/۵ میکرولیتر 10X PCR bufer، ۱/۶ میکرولیتر آب مقطر استریل (DDW) و ۱ میکرولیتر آنزیم Taq DNA (1 unit polymerase /μl). برنامه PCR شامل یک مرحله واسرشت در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۱۰ چرخه تکثیر DNA (۹۴ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه، ۵۳ درجه سانتی گراد ۴۵ ثانیه، ۴۳ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه) و ۲۰ چرخه تکثیر DNA (۹۴ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه، ۵۰ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه) و یک مرحله نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه بود. پس از انجام واکنش ۴ میکرولیتر از محصولات واکنش روی ژل آگارز دو درصد به مدت ۲۰ دقیقه

لشمانیا در این تحقیق استفاده شد. نتایج حاصله در تصویر ۴ و ۵ ارائه شده است. همانطور که در تصویر ۴ مشاهده می شود واکنش PCR با پرایمر AB تا رقت ۷-۱۰ از DNA ژنومیک انجام شده و این در حالی است که واکنش PCR با پرایمر UL تا رقت ۱۰-۵ از DNA ژنومیک انجام شده است (تصویر ۵). نتایج این تحقیق نشان داد که انگل لیشمانیا با استفاده از واکنش PCR با پرایمر AB تا رقت ۵-۱۰ (تصویر ۴ ستون ۵) و با پرایمر UL تا رقت ۳-۱۰ (تصویر ۵ ستون ۴) قابل شناسایی بود. هم چنین حساسیت روش PCR جهت تشخیص انگل لیشمانیا با هر دو جفت پرایمر AB و UL مورد بررسی قرار گرفت. حساسیت روش PCR با پرایمر AB در حد ۳۵ سلول در حجم یک میلی لیتر و با پرایمر UL در حد ۴۰ سلول در حجم یک میلی لیتر بود.

شناسایی انگل لیشمانیا با استفاده از Multiplex-PCR:

جهت شناسایی انگل لیشمانیا به طور همزمان با دو پرایمر AB و UL از روش Multiplex-PCR استفاده شد. همانطور که در تصویر ۶ مشاهده می شود با این روش می توان در یک زمان با پرایمر دو AB و UL انگل لیشمانیا را شناسایی نمود که پس از انجام این واکنش ۲ قطعه ۶۸۳ و ۱۱۵ جفت باز حاصل گردید.



تصویر ۱: نتایج روش مولکولی PCR اولین نمونه های به دست آمده از بیماران با پرایمر AB که پس از بینه سازی واکنش، باند ۱۱۵bp قابل شناسایی گردید. نمونه شماره ۹ نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز، نمونه شماره ۷ استاندارد L. Major، نمونه شماره ۴ استاندارد L. Tropica و بقیه نمونه ها مربوط به بیماران می باشد. نمونه های شماره ۳، ۵، ۶ و ۱۰ PCR شان منفی و نمونه های شماره ۱ و ۲ PCR آن ها مثبت شده است.

نمونه های استاندارد L. Major و L. Tropica به منظور کنترل مثبت در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. سپس نسبت به استخراج DNA و آزمایش PCR با استفاده از پرایمرهای تهیه شده اقدام گردید.

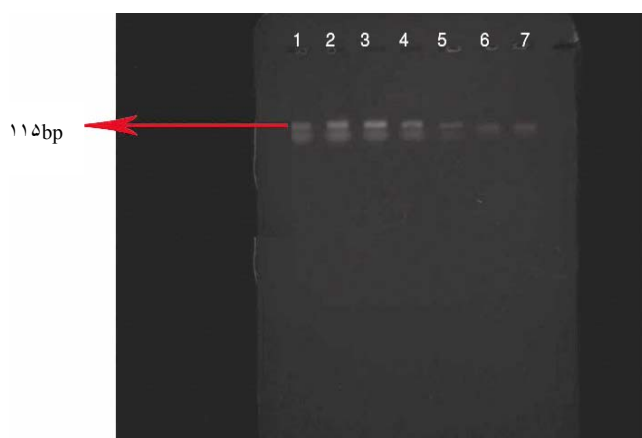
برای جستجوی انگل لیشمانیا ابتدا واکنش PCR با DNA نمونه استاندارد L. Major (تصویر ۱، ستون ۷) و L. Tropica (تصویر ۱، ستون ۴) با یک جفت پرایمر ویژه AB انجام شد که وجود قطعه ۱۱۵ جفت باز، نشان دهنده وجود این ژن در انگل لیشمانیا بود و از این طریق نسبت به شناسایی این انگل اقدام گردید. پس از استاندارد نمودن روش شناسایی، اقدام به تهیه نمونه از بیماران مشکوک گردید که PCR نمونه های شماره ۳ و ۵ و ۶ و ۸ منفی و PCR نمونه های شماره ۱ و ۲ مثبت شده است (تصویر ۱).

برای جستجوی انگل لیشمانیا واکنش PCR با جفت پرایمر ویژه UL انجام شد که وجود قطعه ۶۸۳ جفت باز، نشان دهنده وجود این قطعه از ژن در انگل لیشمانیا بود و از این طریق نسبت به شناسایی انگل L. Tropica (تصویر ۲ ستون ۲) و نیز L. Major (تصویر ۲ ستون ۳). اقدام گردید (تصویر ۲).

نتایج حاصل از برش آنزیمی: پس از انجام برش آنزیمی قطعات بدست آمده توسط ژل آگاروز دو درصد الکتروفورز شد که نتیجه حاصل از الکتروفورز مطابق تصویر ژل ۳ مورد بررسی قرار گرفت.

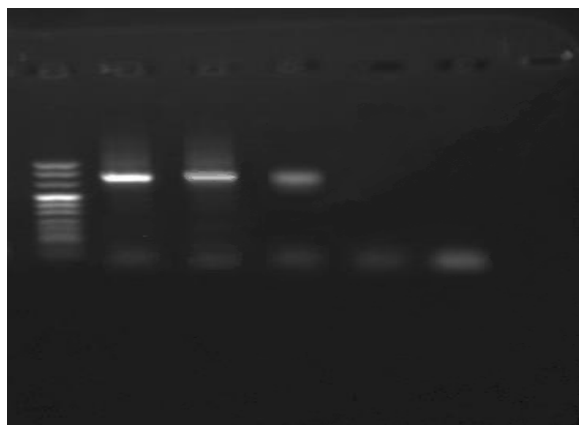
همانگونه که در تصویر مشاهده می شود آنزیم های TaqI و mnlI با برش محصول PCR با پرایمر AB، بترتیب دو قطعه ۲۳ و ۹۲ جفت باز (تصویر ۳، ستون ۴) و دو قطعه ۴۰ و ۷۵ جفت باز (تصویر ۳، ستون ۷) تولید نموده اند. قطعات حاصل از برش آنزیمی با قطعات مورد نظر که توسط نرم افزار DNAsis تعیین شده مطابقت داشت. همچنین آنزیم XhoI با برش محصول PCR با پرایمر UL دو قطعه ۱۴۹ و ۵۳۴ جفت باز (تصویر ۳، ستون ۳) تولید نمود. این قطعات نیز با قطعات مورد نظر که توسط نرم افزار DNAsis تعیین شده بود مطابقت داشت.

تعیین حساسیت واکنش PCR: جهت بررسی تعیین حساسیت واکنش PCR با هر دو پرایمر، از غلظت های مختلف ژنوم انگل



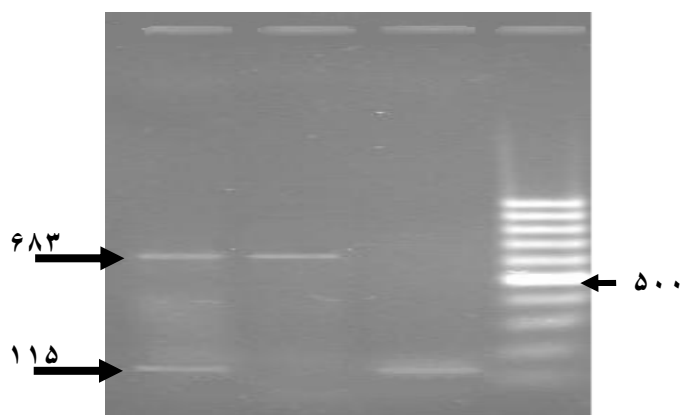
تصویر ۴: تعیین حساسیت پرایمر AB جهت شناسایی انگل های لشمابوز.

ستون ۱: غلظت ۱۰-۱ پرایمر AB
ستون ۲: غلظت ۱۰-۲ پرایمر AB
ستون ۳: غلظت ۱۰-۳ پرایمر AB
ستون ۴: غلظت ۱۰-۴ پرایمر AB
ستون ۵: غلظت ۱۰-۵ پرایمر AB
ستون ۶: غلظت ۱۰-۶ پرایمر AB
ستون ۷: غلظت ۱۰-۷ پرایمر AB



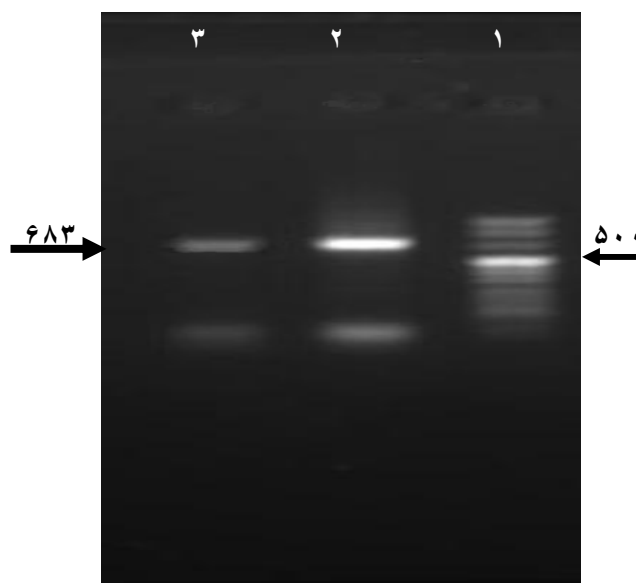
تصویر ۵: نتایج روش مولکولی PCR با پرایمر UL از بیماران که پس از بهینه سازی واکنش، باند ۶۸۳bp قابل شناسایی گردید.

ستون ۱: غلظت ۱۰-۵
ستون ۲: غلظت ۱۰-۴
ستون ۳: غلظت ۱۰-۳
ستون ۴: غلظت ۱۰-۲
ستون ۵: غلظت ۱۰-۱ پرایمر UL
ستون ۶: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز



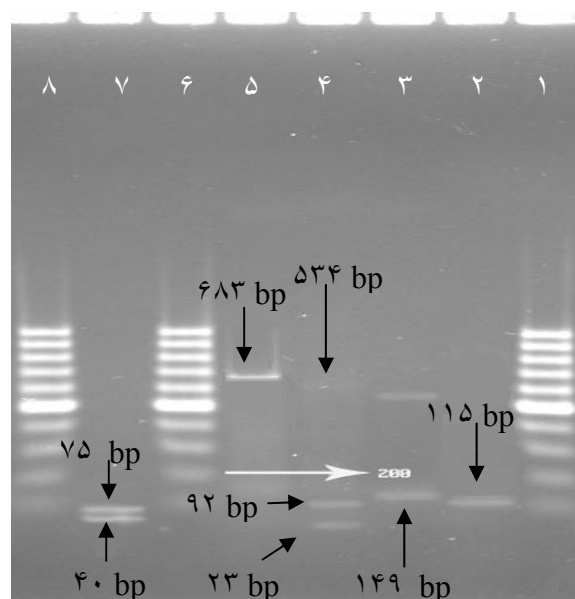
تصویر ۶: بررسی حساسیت روش مولکولی Multiplex-PCR با پرایمر AB و UL

ستون ۱: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز
ستون ۲: محصول PCR با پرایمر AB
ستون ۳: محصول PCR با پرایمر UL
ستون ۴: محصول Multiplex PCR با دو پرایمر AB و UL



تصویر ۲: نتیجه حاصل از الکتروفورز محصول واکنش PCR با پرایمر UL

شماره ۱: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز

شماره ۲: قطعه تکثیر یافته ۶۸۳ جفت بازی ویژه شناسایی *L. Tropica*شماره ۳: قطعه تکثیر یافته ۶۸۳ جفت بازی ویژه شناسایی *L. Major*

تصویر ۳: نتایج حاصل از برش آنزیمی

نمونه ۲ محصول PCR با پرایمر AB به عنوان کنترل مثبت

نمونه ۳ حاصل برش آنزیمی توسط آنزیم محدودالایر XhoI که محصول آن دو قطعه ۱۴۹ bp و ۵۳۴ bp است

نمونه ۴ حاصل برش آنزیمی توسط آنزیم محدودالایر TaqI که محصول آن دو قطعه ۲۳ bp و ۹۲ bp است.

نمونه ۵ محصول PCR با پرایمر UL به عنوان کنترل مثبت

نمونه ۷ حاصل برش آنزیمی توسط آنزیم محدودالایر mnlI که محصول آن دو قطعه ۷۵ bp و ۴۰ bp می باشد

نمونه ۸ و ۶، ۱۰۰ جفت باز می باشند

بحث

بیماری لشمانيوز يکي از بيماري‌هاي پوستي مي‌باشد که مشترک بين انسان و دام بوده و بعد از مالاريا به عنوان يک معضل بهداشتي در جهان مورد توجه قرار گرفته است (۱). Lobsiger و همکاران براي اولين با اين بيماري را در گاو گزارش کرد (۱۸) تشخيص اين بيماري به دليل شباهت‌هايي که با تعدادي از عفونت‌هاي باکتريايي و نيز قارچي دارد پيچيده بوده و جهت تشخيص قطعي نياز به تست‌هاي اضافي از جمله کشت انگل، تست‌هاي سرولوژيکي، تست پوستي ليشمانيا است که عمدتاً وقت گير و هزينه بر مي‌باشد. اگرچه کشت پروماستيگوت از بافت آلوده و مشاهده آن درزير ميكروسکوپ يکي از روش‌هاي استاندارد و اختصاصي جهت تشخيص لشمانيوز مورد استفاده قرار مي‌گرفته ولي از حساسيت زيادي برخوردار نمي‌باشد. لذا محققين به روش‌هاي مولکولي که از حساسيت بالايي برخوردار است جهت شناسايي عوامل بيماريزا استفاده نموده‌اند. ارزيابي و مقايسه روش‌هاي تشخيصي لشمانيوز داراي اهميت ويژه‌اي است. در اين تحقيق روش PCR با روش ميكروسکوپي و روش کشت مورد مقايسه قرار گرفت و روش ميكروسکوپي پايين‌ترين حساسيت را به ما نشان داد. اين نتيجه با مطالعه Aviles و همکاران (۱۹) که حساسيت ميكروسکوپي را ۴۲ درصد گزارش کرده تطابق دارد. در مطالعه‌اي که در ترکيه توسط Culha و همکاران بر روي ۲۵ نمونه انجام شد ۶۷ درصد از نمونه‌ها به روش ميكروسکوپي شناسايي شدند که در مقايسه با مطالعه حاضر حساسيت بالاتري را نشان داد، تفاوت نتايج به علت مطالعه بر روي لشمانيوز جلدی نوع روستايي بود که عامل آن ليشمانيا تروپيکا است و اينگونه از انگل معمولاً نسبت به ليشمانيا ماژور (عامل نوع روستايي) به ميزان فراوان‌تري در زخم وجود دارد (۲۰). اين درحالي است که حساسيت روش کشت نيز از روش ميكروسکوپي بيشتتر بود ولي نسبت به روش PCR حساسيت کمتری را نشان داد (۲۱). نتايج بدست آمده در اين مطالعه با گزارش Barrio و همکاران که در يک ارزشيابي PCR براي تشخيص لشمانيوز مخاطي ۴۵ مورد از ۴۵ مورد (۱۰۰٪) را تشخيص دادند (۲۲) مطابقت دارد.

Marques و همکاران در مطالعه مقايسه روش PCR (قطعه ثابت از kDNA) با روش ميكروسکوپي و تست جلدی مونته‌نگرو (Montenegro Skin Test) براي تشخيص لشمانيوز جلدی آمريکايي، دريافتند که روش PCR مي‌تواند به عنوان روشي جايگزين براي شناسايي اين نوع بيماري به خصوص براي مواردی که با تست جلدی و مونته‌نگرو منفي تشخيص داده مي‌شوند به کار رود (۲۳).

به منظور بررسي حساسيت روش‌هاي شناسايي انگل لشمانيوز، Bensoussan و همکاران از روش ميكروسکوپي، روش کشت و سه روش PCR استفاده نمودند. در اين تحقيق که بر روي ۹۲ مورد بيمار مبتلا به لشمانيوز پوستي انجام گرفت kDNA-PCR بيشتترين حساسيت را نسبت به بقيه روش‌ها (۹۸/۷٪) نشان داد (۲۴).

Jorquera و همکاران با استفاده از روش Multiplex-PCR، ليشمانياي وحشي را تشخيص دادند. آنها نمونه‌هاي لشمانيوز پوستي را در يک منطقه اندميك مورد بررسي قرار داده بودند (۲۵).

Venazzi و همکاران براي تشخيص لشمانيوز پوستي آمريکايي، روش PCR را با ديگر روش‌هاي متداول مورد بررسي قرار دادند. از ۱۵۶ بيمار مورد مطالعه ۷۹ نفر (۵۰/۶٪) با روش تشخيص مستقيم انگل مثبت شدند و ۸۱ نفر (۵۱/۹٪) تست پوستي متتگرو (MCT) آنها مثبت شد، ۹۰ نفر (۵۷/۷٪) با هر دو روش مثبت شدند (ترکيب روش MCT و تشخيص مستقيم انگل) همچنين همه آنهايي که با روش تشخيص مستقيم انگل مثبت بودند، با روش PCR هم مثبت بودند (حساسيت ۱۰۰٪)، آنهايي که روش ترکيبي روي آنها انجام شده بود (۹۱/۱٪) با PCR، مثبت شدند. از افرادي که تست مستقيم انگل آنها منفي و تست متتگرو مثبت بود (۲۷/۳٪) PCR آنها نيز مثبت بود. مثبت بودن نمونه‌ها با PCR با تست مستقيم انگل يکسان ($P=0/2482$) و کمتر از تست پوستي متتگرو بود (۰/۴۵۵) که با روش ترکيبي همخواني داشت ($P=0/0133$). حساسيت بالاي PCR و مثبت شدن اين نمونه‌ها که با روش مستقيم انگل منفي بود، نکته برجسته و مهمي است که اهميت تکنیک PCR را به عنوان يک روش

برای تشخیص لیشمانیوز پوستی آمریکایی نشان می‌داد (۲۶).

Kumar همکاران آنالیز کلینیکی اپیدمیولوژیکی ۹۸ مورد بیمار مبتلا به لیشمانیوز پوستی را با روش ITS1-PCR و RFLP و kDNA-PCR و روش ایمونوفلورسنت در مناطق اندمیک ایالت راجاستن (هند) مورد بررسی قرار داده و L. Tropica را عامل این بیماری معرفی نمودند. در این مطالعه روش‌های kDNA-PCR (۹۶/۶٪) و ITS1-PCR (۸۲/۷۵٪)، روش کشت ۴۸/۲٪، بررسی میکروسکوپی ۶۵/۵٪ نمونه‌های مثبت را توانستند گزارش نمایند (۲۷).

مقایسه نتایج به دست آمده در این تحقیق با نتایج به دست آمده توسط دانشمندان دیگر به دلایلی از جمله مطالعه بر روی نوع انگل (نوع لیشمانیوز جلدی، نوع احشایی، نوع شهری و یا نوع روستایی)، زمان نمونه‌برداری (تعداد انگل موجود در زخم لیشمانیوز معمولاً با پیشرفت دوره زخم کاهش پیدا می‌کند) و همچنین فراوانی انگل در نمونه‌های برداشت شده، دلیلی بر متفاوت بودن نتایج آزمایشات در این مطالعه می‌باشد. روش‌های خالص سازی DNA و نیز نوع ژن

منابع:

- 1- Hanafi AA. *Evaluation of cutaneous leishmaniasis in Ardestan*. MSc[dissertation]. Tehran: Tehran University; 1998.[Persian]
- 2- Davies CR, Reithinger R, Campbell-Lendrum D, Feliciangeli D, Borges R., Rodriguez N. *The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries*. Cad Saúde Pública. 2000; 16(4): 925-50.
- 3- Boakye DA, Wilson MD, Kweku M. *A review of leishmaniasis in West Africa*. Ghana Med J. 2005; 39(3): 94-7.
- 4- Bush A, Fernandez JC, Esch G. *Parasitism the diversity and ecology of animal parasites*. Cambridge: University Press 2001:60-1.
- 5- Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Boer MD, Cañavate C, Dedet JP, et al. *The Relationship between Leishmaniasis and AIDS: the Second 10 Years*. Clin Microbiol Rev. 2008; 21(2): 334-59.
- 6- Schriefer A, Guimarães LH, Machado PRL, Lessa M, Lessa HA, Lago E, et al. *Geographic Clustering of Leishmaniasis in Northeastern Brazil*. Emerg Infect Dis. 2009; 15(6): 871-6
- 7- Bern C, Maguire JH, Alvar J. *Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis*. PLoS Negl Trop Dis. 2008; 2(10): e313.

یا قطعه DNA مورد هدف نیز می‌تواند از عوامل موثر بر تفاوت نتایج بدست آمده در این مطالعات باشد (۲۸).

نتیجه‌گیری

روش Multiplex-PCR که در این تحقیق استفاده گردید، روش بسیار مؤثر و کاربردی در شناسایی انگل لیشمانیا به شمار می‌رود که امکان شناسایی بیماری لیشمانیوز پوستی را با دو جفت پرایمر AB و UL فراهم می‌آورد. از مزایای مهم این روش تشخیص سریع در مدت زمان کوتاه است، به گونه‌ای که پس از آماده نمودن نمونه، در عرض کمتر از سه ساعت، شناسایی و تعیین گونه انگل لیشمانیا امکان‌پذیر است. هر چند از معایب احتمالی در واکنش PCR وجود مهار کننده‌ها است که می‌تواند باعث ایجاد خطای کاذب در حین واکنش گردد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از معاونت پژوهش دانشکده علوم و مهندسی و نیز اداره تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... که زمینه انجام این تحقیق را فراهم ساختند کمال تشکر را داریم.

- 8- Abdel Wahab RM, Morsy TA, Essa MH. *Clinical and laboratory aspects of visceral leishmaniasis in Gizan, Saudi Arabia*. J Egypt Soc Parasitol. 1984; 14 (2): 563-572.
- 9- Rassi Y, Javadian E, Jalali M, Motazedian MH, Vatndoost H. *Study on zoonotic leishmaniasis in arsanjan country, fars province, southern Iran*. Iranian J Public Health. 2004; 33(1): 28-32.
- 10- Yaghoobi-Ershadi MR, Akhavan AA, Zahraei-Ramazani AV, Abai MR, Ebrahimi B, et al. *Epidemiological study in a new focus of cutaneous leishmaniasis in the Islamic republic of Iran*. East Mediterr Health J. 2003; 9(4): 816-26 .
- 11- Yaghoobi-Ershadi MR, Hanafi-Bojd AA, Akhavan AA, Zahraei-Ramazani AR, Mohebbali M. *Epidemiological study in a new focus of cutaneous due to leishmania major in ardstan town, central Iran*. Acta Trop 2001; 79(2): 115-21.
- 12- Yaghoobi-Ershadi MR, Akhavan AA, Mohebbali M. *Monthly variation of leishmania major MON-26 infection rates in phlebotomus papatasi (Diptera: Psychodidae) from rodent burrows in Badrood area of Iran*. Med J IR Iran. 2001; 15(3): 175-8.
- 13- Noyes HA, Reyburn H, Bailey JW, Smith DA. *Nested-PCR-based schizodeme method for identifying Leishmania kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of Leishmania tropica in Pakistan*. J Clin Microbiol. 1998; 36(10): 2877-81.
- 14- Mahboudi F, Abolhassani 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(8): 596-8.
- 15- Safaie A, Motazedian MH, Vasei M. *Polymerase chain reaction for diagnosis of cutaneous leishmaniasis in histologically positive, suspicious and negative skin biopsies*. Dermatology. 2002; 205(1):18-24.
- 16- Rodriguez-Bonfante C, Bonfante-Garrido R, Grimaldi G Jr, Momen H, Cupolillo E. *Genotypically distinct Leishmania colombeinsis isolates from Venezuela cause both cutaneous and visceral leishmaniasis in humans*. Infect Genet Evol. 2003; 3(2): 119-24.
- 17- Talmi-Frank D, Nasereddin A, Schnur LF, Schönián G, Töz SÖ, Jaffe CL, et al. *Detection and identification of old world Leishmania by high resolution melt analysis*. PLoS Negl Trop Dis. 2010; 4(1): e581.
- 18- Lobsiger L, Müller N, Schweizer T, Frey CF, Wiederkehr D, Zumkehr B, et al. *An autochthonous case of cutaneous bovine leishmaniasis in Switzerland*. Vet Parasitol. 2010; Jan 25.[Epub aahead of print]
- 19- Aviles H, Belli A, Armijos R, Monroy FP, Harris E. *PCR Detection and identification of Leishmania parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods*. J Parasitol. 1999; 85 (2): 181-7.
- 20- Culla G, Uzun S, Ozcan K, Memisoglu-Hamdi R, Chang KP. *Comparison of conventional and polymerase chain rection diagnostic techniques for leishmaniasis in the endemic region of Adana, Turkey*. Int J Dermatol. 2006; 45(5):569-72.

- 21- Myjak P, Szulta J, de Almeida ME, da Silva AJ, Steurer F, Lass A, et al. *Usefulness of PCR method for detection of Leishmania in Poland*. Pol J Microbiol. 2009; 58(3): 219-22.
- 22- Barrio A, Mora MC, Ramos F, Moreno S, Samson R, Basombrío MA. *Use of kDNA-based Polymerase Chain Reaction as a Sensitive and Differentially Diagnostic Method of American Tegumentary Leishmaniasis in Disease-Endemic Areas of Northern Argentina*. Am J Trop Med Hyg 2007; 77(4): 636-9.
- 23- 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 of cutaneous leishmaniasis by polymerase chain reaction*. Diagn Microbial Infect Dis. 2006; 54(1):37-43.
- 24- 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): 1435–1439.
- 25- Jorquera A, González R, Marchán-Marcano E, Oviedo M, Matos M. *Multiplex-PCR for detection of leishmania infection in Lutzomyia spp. Captured in an endemic region for cutaneous leishmaniasis in state of sucre, Venezuela*. Mem Inst Oswaldo cruz. 2005; 100 (1): 45-8.
- 26- Venazzi EA, Roberto AC, Barbosa- Tessmann IP, Zanzarini PD, Lonardoin MV, Silveria TG. *Polymerase chain reaction with lesion scraping for the diagnosis of human American tegumentary leishmaniasis*. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006; 101(4): 427-30.
- 27- Kumar R, Bumb RA, Ansari NA, Mehta RD, Salotra P. *Cutaneous leishmaniasis caused by leishmania tropica in Bikaner, India: parasite identification and characterization using molecular and immunologic tools*. Am J Trop Med Hyg 2007; 76 (5): 896-901.
- 28- Reithinger R, Lambson BE, Barker DC, Davies CR. *Use of PCR to detect leishmania (Viannia) spp. in dog blood and bone marrow*. J Clin Microbiol. 2000; 38(2): 748-51.