Journal of Shaheed Sadoughi University of Medical Sciences
Vol 18, No 2, Jun/Jul 2010
Pages: 118-126

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۱۸، شماره ۲، خرداد و تیر ۱۳۸۹
صفحه: ۱۲۶-۱۱۸

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

تاریخ دریافت:۱۳۸۸/۵/۱۴ تاریخ پذیرش:۱۳۸۸/۱۱/۱۵

چکیده

مقدمه: سالیانه بیش از ۱۴ میلیون انسان آلوده به لشمانیوز 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 لشمانیوز 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 RNAی ریبوزومی، DNA کینتوپلاستی و یا ترتیب‌های تکراری استفاده شده است. هدف از این مطالعه تشخیص سریع لشمانیوز 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 لشمانیوز جلدی انجام شد. ابتدا ژنوم انگل با روش فنل-کلروفرم تخلیص شد. با استفاده ازروش PCR و پرایمر مناسب، تکثیر DNA مورد نظر صورت پذیرفت. محصول به دست آمده هم زمان با محصول DNA تکثیر شده سویه‌های استاندارد، الکتروفورز و پس از مقایسه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. از دو نمونه استاندارد Leishmania. major و Leishmania. tropica به عنوان کنترل مثبت نیز استفاده گردید.

نتایج: طول محصول PCR با پرایمر، AB ۱۱۵ جفت باز و با پرایمرUL، 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 لشمانیوز 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- لشمانیوز جلدی- بیماری‌های پوستی

* (نویسنده مسئول)؛ تلفن:۷۷۱۰۴۸۷۳-۰۲۱، نمابر: ۷۷۱۰۴۹۸۰-۰۲۱ پست الکترونیکی: saadati_m@yahoo.com

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

مقدمه

بیماری لشمانیوز 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. لشمانیوز 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(۴-۲). حدود ۱۴ میلیون نفر به این بیماری مبتلا می‌باشند و سالانه بین ۲-۱/۵ میلیون مورد جدید لشمانیوز در دنیا رخ می‌دهد. ۹۰ درصد موارد لشمانیوز جلدی از ۷ کشور افغانستان، الجزایر، برزیل، پرو، ایران، عربستان سعودی و سوریه گزارش شده است(۸-۵). در ایران لشمانیوز جلدی (خشک و مرطوب) و احشایی از بیماری‌های مهم انگلی می‌باشد که لشمانیوز جلدی در ایران به دو فرم شهری (خشک) و روستایی (مرطوب) وجود دارد و هر کدام دارای کانون های متعددی هستند(۱۰،۹).

استان یزد از مناطقی است که در سال‌های اخیر با مشکل جدی لشمانیوز 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 ۸۷-۱۳۸۶مطالعات جامعی در زمینه اپیدمیولوژی لشمانیوز 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 لشمانیوز جلدی روستایی در ایران Leishmania Major و عامل لشمانیوز جلدی شهری Leishmania Tropica می‌باشد که بیماری لشمانیوز جلدی توسط گونه‌های خاصی از پشه خاکی‌های فلبوتومینه منتقل می‌گردد(۱۲،۱۱).

روش‌های مختلفی توسط محققین جهت شناسایی انگل لشمانیا مورد استفاده قرار گرفته که هر کدام دارای معایب و مزایایی می‌باشد که در این میان روش مولکولیPCR 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 لشمانیوز پوستی (سالک) با استفاده از روش Multiplex-PCR بود تا بدین وسیله بتوان در مدت زمان کوتاهی نمونه‌های بیماری که مشکوک به بیماری لشمانیازیس هستند شناسایی شوند تا بتوان پس از تشخیص سریع نسبت به درمان مبتلایان اقدام نمود.

روش بررسی

آنزیم Taq DNA Polymerase، آنزیم‌های محدودالاثر و 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 لشمانیوز پوستی انجام شد. این تعداد نمونه از بیماران مراجعه کننده به متخصص پوست در زمان شیوع بیماری لشمانیوز 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 انستیوپاستور 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 پروماسیتگوت انگل به محیط کشت RPMI-۱۶۴۰ منتقل و به تعداد زیاد پاساژ داده شد تا افزایش حداکثری در تعداد انگل مشاهده شود. سپس مرحله رسوب‌گیری از انگل لیشمانیا انجام گرفت.

پس از انتخاب قطعات ژنی مناسب، نسبت به تهیه پرایمرهای

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

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

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

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

ب) U: GGG GTT GGT GTA AAA TAG GCC (F)

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

پرایمرAB قطعه‌ای به طول bp ۱۱۵ و پرایمر UL قطعه‌ای به طول bp ۶۸۳ 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 پلیمراز (PCR): برای انجام فرآیند Multiplex-PCR، ۱ میکرولیتراز 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 (پرایمرAB و پرایمر UL) با غلظت ۱۰µl/mol p (در مجموع۲ میکرولیتر)، ۱ میکرولیتر از مخلوط dNTP باغلظت ۱/۵mM میکرولیترMgCl2 باغلظت ۲mM، ۲/۵ میکرولیتر 10X PCR bufer، ۱۶/۵ میکرولیتر آب مقطراستریل(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، ۱۰چرخه تکثیر DNA (۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ثانیه، ۵۳ درجه سانتی گراد ۴۵ثانیه،۴۳ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه) و ۲۰ چرخه تکثیرDNA (۹۴ درجه سانتی گراد ۳۰ثانیه، ۵۰ درجه سانتی‌گراد ۳۰ثانیه،۷۲ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه) و یک مرحله نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت۷ دقیقه بود. پس از انجام واکنش ۴ میکرو لیتر از محصولات واکنش روی ژل آگارز دو درصد به مدت ۲۰ دقیقه 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 نرم‌افزار 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 Taq1 ،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 اندازه‌گیری OD محیط کشت، ابتدا از محیط مورد نظر تا 10^{-1} رقت تهیه کرده و برای تمامی رقت‌ها 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 باکتری‌های کمپیلوباکتر ژژونی، استافیلوکوک ارئوس، استرپتوکوک پنومونیه، باسیلوس سرئوس، کلبسیلا پنومونیه انجام شد و محصول واکنش با ژل آگارز دو درصد الکتروفورز شد.

آنالیزآماری: تجزیه و تحلیل آماری جهت تعیین تفاوت‌های بین دو روش UL و AB با استفاده از آزمون آماری مک نمار(McNemar) انجام گردید که با توجه به این آزمون و سطح معنی‌داری آن(P=۱) نشان داده شده که بین دو روش UL و AB در شناسایی نتایج آزمون‌ها (مثبت ومنفی بودن آنها) اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

نتایج

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

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

نمونه‌های 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 لشمانیا 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 لشمانیا 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 نمونه‌های شماره ۳ و ۵ و ۶ و ۸ منفی و PCR نمونه‌های شماره ۱و۲ مثبت شده است(تصویر ۱).

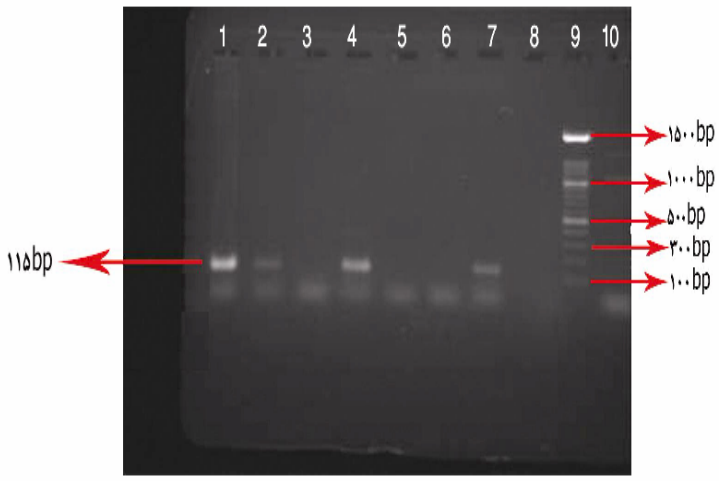
برای جستجوی انگل لشمانیا واکنش PCR با جفت پرایمر ویژه UL انجام شد که وجود قطعه ۶۸۳ جفت باز، نشان دهنده وجود این قطعه ازژن در انگل لشمانیا بود و از این طریق نسبت به شناسایی انگل L. Tropica (تصویر ۲ ستون ۲) و نیز L. Major (تصویر ۲ ستون ۳). اقدام گردید(تصویر ژل ۲).

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

همانگونه که در تصویر مشاهده می‌شود آنزیم‌های Taq1 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 نموده‌اند. 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.

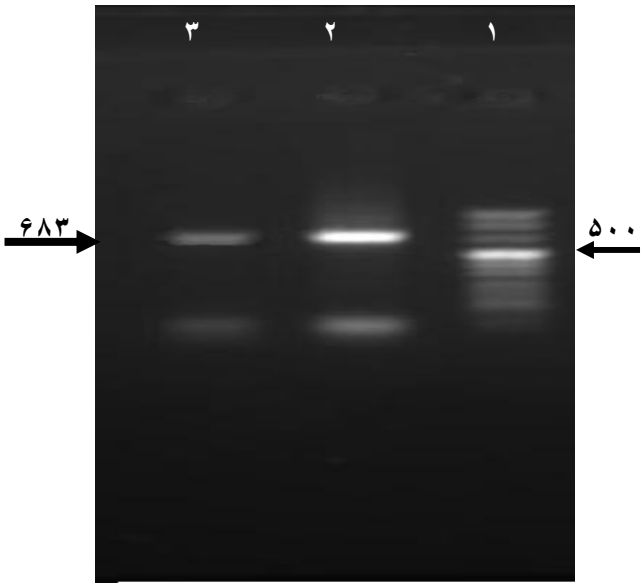
تعیین حساسیت واکنش PCR: جهت بررسی تعیین حساسیت واکنش PCR با هر دو پرایمر، از غلظت‌های مختلف ژنوم انگل لشمانیا در این تحقیق استفاده شد. نتایج حاصله در تصویر ۴ و ۵ ارائه شده است. همانطور که در تصویر ۴ مشاهده می‌شود واکنش PCR با پرایمر AB تا رقت ۷-۱۰ از DNA ژنومیک انجام شده و این در حالی است که واکنش PCR 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 میلی‌لیتر و با پرایمر UL در حد ۴۰ سلول در حجم یک میلی‌لیتر بود.

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



تصویر ژل ۱: نتایج روش مولکولی PCR اولین نمونه های به دست آمده از بیماران با پرایمر AB که پس از بهینه سازی واکنش، باند ۱۱۵bp قابل شناسایی گردید. نمونه شماره ۹ نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز، نمونه شماره ۷ استاندارد L. Major، نمونه شماره ٤ استاندارد L. Tropica و بقیه نمونه ها مربوط به بیماران می باشد. نمونه های شماره ۳، ٥، ٦ و ۱۰ PCR شان منفی و نمونه های شماره ۱و۲ PCR آن ها مثبت شده است.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

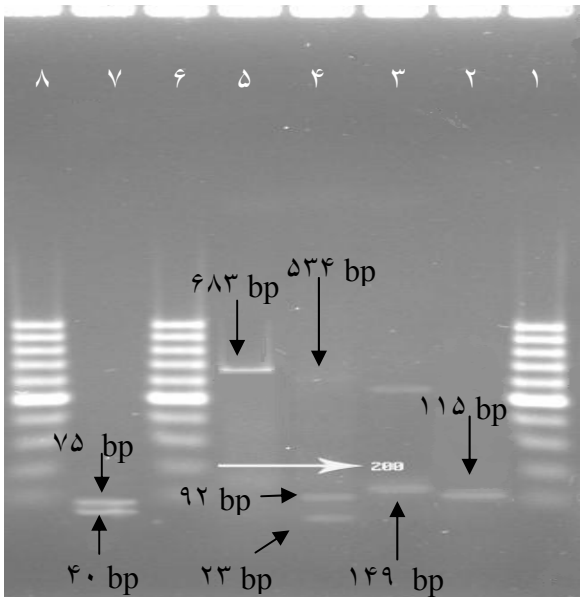


تصویر ۲: نتیجه حاصل از الکتروفورز محصول واکنش PCR با پرایمر UL

شماره ۱: : نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز

شماره ۲: قطعه تکثیر یافته ٦٨٣ جفت بازی ویژه شناسایی L. Tropica

شماره ۳: قطعه تکثیر یافته ٦٨٣ جفت بازی ویژه شناسایی L. Major



تصویر ۳: نتایج حاصل از برش آنزیمی

نمونه ۲ محصول PCR با پرایمر AB به عنوان کنترل مثبت

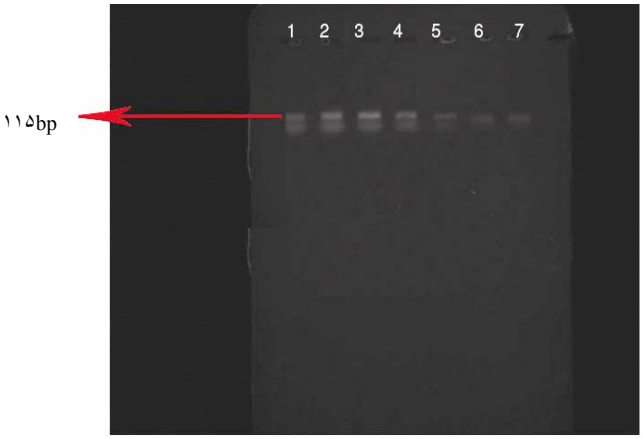
نمونه ۳ حاصل برش آنزیمی توسط آنزیم محدودالاثر XHOI که محصول آن دو قطعه ۱٤۹ bp و ٥۳٤ bp است

نمونه ٤ حاصل برش آنزیمی توسط آنزیم محدودالاثر TaqI که محصول آن دو قطعه ۲۳ bp و ۹۲ bp است.

نمونه ٥ محصول PCR با پرایمر UL به عنوان کنترل مثبت

نمونه ۷ حاصل برش آنزیمی توسط آنزیم محدودالاثر mnlI که محصول آن دو قطعه bp ٤۰ و ۷٥ bp می باشد

نمونه ۱، ٦ و ۸ نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز می باشند



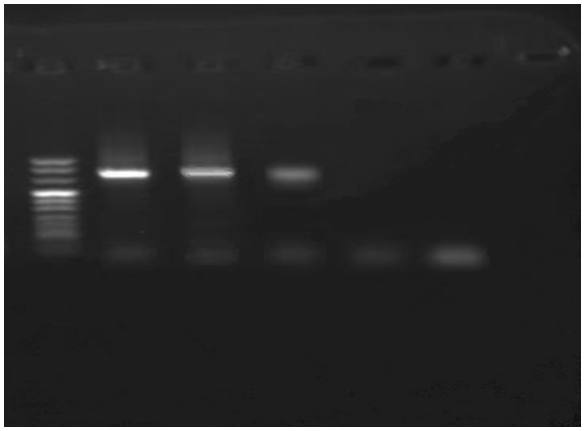
تصویر ٤: تعیین حساسیت پرایمر AB جهت شناسایی انگل های لشمانیا.

ستون ۱: غلظت ۱-۱۰ پرایمر AB — ستون ۲: غلظت ۲-۱۰ پرایمر AB

ستون ۳: غلظت ۳-۱۰ پرایمر AB — ستون ٤: غلظت ٤-۱۰ پرایمر AB

ستون ٥: غلظت ٥-۱۰ پرایمر AB — ستون ٦: غلظت ٦-۱۰ پرایمر AB

ستون ۷: غلظت ۷-۱۰ پرایمر AB

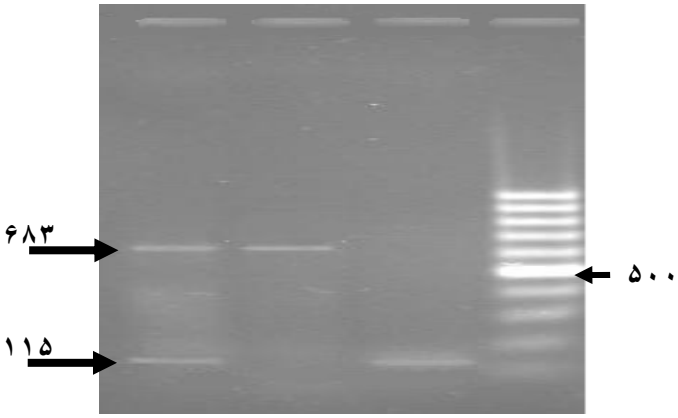


تصویر ژل ٥ : نتایج روش مولکولی PCR با پرایمر UL از بیماران که پس از بهینه سازی واکنش، باند ٦٨٣bp قابل شناسایی گردید.

ستون ۱: غلظت $۱۰^{-٥}$ — ستون ۲: غلظت $۱۰^{-٤}$

ستون ۳: غلظت $۱۰^{-۳}$ — ستون ٤: غلظت $۱۰^{-۲}$

ستون ٥: غلظت $۱۰^{-۱}$ پرایمر UL — ستون ٦: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز



تصویر ٦: 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 ٤: محصول Multiplex PCR با دو پرایمر AB و UL

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

بحث

بیماری لشمانیوز یکی از بیماری‌های پوستی می‌باشد که مشترک بین انسان و دام بوده و بعد از مالاریا به عنوان یک معضل بهداشتی در جهان مورد توجه قرار گرفته است(۱). Lobsiger و همکاران برای اولین با این بیماری را در گاو گزارش کرد(۱۸) تشخیص این بیماری به دلیل شباهت‌هایی که با تعدادی از عفونت‌های باکتریایی و نیز قارچی دارد پیچیده بوده و جهت تشخیص قطعی نیاز به تست‌های اضافی از جمله کشت انگل، تست‌های سرولوژیکی، تست پوستی لیشمانیا است که عمدتاً وقت‌گیر و هزینه بر می‌باشد. اگرچه کشت پروماستیگوت از بافت آلوده و مشاهده آن درزیر میکروسکوپ یکی از روشهای استاندارد و اختصاصی جهت تشخیص لشمانیوز مورد استفاده قرار می‌گرفته ولی از حساسیت زیادی برخوردار نمی‌باشد. لذا محققین به روش‌های مولکولی که از حساسیت بالایی برخوردار است جهت شناسایی عوامل بیماریزا استفاده نموده‌اند. ارزیابی و مقایسه روش‌های تشخیصی لشمانیوز دارای اهمیت ویژه‌ای است. در این تحقیق روش PCR با روش میکروسکوپی و روش کشت مورد مقایسه قرار گرفت و روش میکروسکوپی پایین‌ترین حساسیت را به ما نشان داد. این نتیجه با مطالعه Aviles و همکاران(۱۹) که حساسیت میکروسکوپی را ۴۲ درصد گزارش کرده تطابق دارد. در مطالعه‌ای که در ترکیه توسط Culha و همکاران بر روی ۲۵ نمونه انجام شد ۶۷ درصد از نمونه‌ها به روش میکروسکوپی شناسایی شدند که در مقایسه با مطالعه حاضر حساسیت بالاتری را نشان داد، تفاوت نتایج به علت مطالعه بر روی لشمانیوز جلدی نوع روستایی بود که عامل آن لیشمانیا تروپیکا است و اینگونه از انگل معمولاً نسبت به لیشمانیا ماژور(عامل نوع روستایی) به میزان فراوان‌تری در زخم وجود دارد(۲۰). این درحالی است که حساسیت روش کشت نیز از روش میکروسکوپی بیشتر بود ولی نسبت به روش PCR حساسیت کمتری را نشان داد(۲۱). نتایج بدست آمده در این مطالعه با گزارش Barrio و همکاران که در یک ارزشیابی PCRبرای تشخیص لشمانیوز مخاطی ۴۵ مورد از ۴۵ مورد(۱۰۰٪) را تشخیص دادند(۲۲) مطابقت دارد.

Marques و همکاران در مطالعه مقایسه روش PCR (قطعه ثابت از kDNA) با روش میکروسکوپی و تست جلدی مونته‌نگرو (Montenegro Skin Test) برای تشخیص لشمانیوز جلدی آمریکایی، دریافتند که روش PCR می‌تواند به عنوان روشی جایگزین برای شناسایی این نوع بیماری به خصوص برای مواردی که با تست جلدی و مونته نگرومنفی تشخیص داده می‌شوند به کار رود(۲۳).

به منظور بررسی حساسیت روش‌های شناسایی انگل لشمانیوز، Bensoussan و همکاران از روش میکروسکوپی، روش کشت و سه روش PCR استفاده نمودند. در این تحقیق که بر روی ۹۲ مورد بیمار مبتلا به لشمانیوز پوستی انجام گرفت kDNA-PCR بیشترین حساسیت را نسبت به بقیه روش‌ها (۹۸/۷٪) نشان داد(۲۴).

Jorquera و همکاران با استفاده از روش Maltiplex-PCR، لیشمانیای وحشی را تشخیص دادند. آنها نمونه‌های لشمانیوز پوستی را در یک منطقه اندمیک مورد بررسی قرار داده بودند(۲۵).

Venazzi و همکاران برای تشخیص لشمانیوز پوستی آمریکایی، روش PCR را با دیگر روش‌های متداول مورد بررسی قرار دادند. از ۱۵۶ بیمار مورد مطالعه ۷۹ نفر (۵۰/۶٪) با روش تشخیص مستقیم انگل مثبت شدند و ۸۱ نفر (۵۱/۹٪) تست پوستی منتگرو (MCT) آنها مثبت شد، ۹۰ نفر (۵۷/۷٪) با هر دو روش مثبت شدند (ترکیب روش MCT و تشخیص مستقیم انگل) همچنین همه آنهایی که با روش تشخیص مستقیم انگل مثبت بودند، با روش PCR هم مثبت بودند(حساسیت ۱۰۰٪)، آنهایی که روش ترکیبی روی آنها انجام شده بود (۹۱/۱٪) با PCR، مثبت شدند. از افرادی که تست مستقیم انگل آنها منفی و تست منتگرو مثبت بود(۲۷/۳٪) PCR آنها نیز مثبت بود. مثبت بودن نمونه‌ها با PCR با تست مستقیم انگل یکسان(P =۰/۲۴۸۲) و کمتر از تست پوستی منتگرو بود(۰/۰۴۵۵) که با روش ترکیبی همخوانی داشت (P=۰/۰۱۳۳). حساسیت بالای PCR و مثبت شدن این نمونه‌ها که با روش مستقیم انگل منفی بود، نکته برجسته و مهمی است که اهمیت تکنیک PCR را به عنوان یک روش

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

برای تشخیص لشمانیوز پوستی آمریکایی نشان می‌داد(۲۶).

Kumar همکاران آنالیز کلنیکی اپیدمیولوژیکی ۹۸ مورد بیمار مبتلا به لشمانیوز پوستی را با روش ITS1-PCR و RFLP و kDNA-PCR و روش ایمنوفلورسنت 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 لشمانیوز جلدی، نوع احشایی، نوع شهری و یا نوع روستایی)، زمان نمونه‌برداری (تعداد انگل موجود در زخم لشمانیوز معمولاً با پیشرفت دوره زخم کاهش پیدا می‌کند) و همچنین فراوانی انگل درنمونه‌های برداشت شده، دلیلی بر متفاوت بودن نتایج آزمایشات در این مطالعه می‌باشد. روش‌های خالص سازی DNA و نیز نوع ژن 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 لشمانیوز 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.

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.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

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(l): 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, Mohebali M. ***Epidemiological study in a new focus of cutaneous due to leishmania major in ardastan town, central Iran.*** Acta Trop 2001; 79(2): 115-21.

12- Yaghoobi-Ershadi MR, Akhavan AA, Mohebali 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, Schönian 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.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

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 inlutzomyia 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 scrapping for the diagnosis of human American tegumentary leishmaniasis.*** Mem Inst Owaldo Cruz 2006; 101(4): 427-30.

27- Kumar R, Bumb RaA, Ansari NA, Mehta RD, Salotra P. ***Cutaneous leishmaniasis caused by leishmania tropica in bikaner, India parasite identification and characterizatoin 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 Microbial. 2000; 38(2): 748-51.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]