فصلنامه دانش و تندرستی، دوره ۶، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۰
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود

مقاله پژوهشی

تعیین هویت انگل بیماری لیشمانیوز جلدی (سالک) به روش PCR در مناطق آلوده استان گلستان

فریده توحیدی*[۱] (M.Sc.)، افسانه برقعی[۲] (Ph.D.)
۱- دانشگاه علوم پزشکی گلستان- گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی- مربی. ۲- دانشگاه علوم پزشکی گلستان- گروه پزشکی اجتماعی- استادیار.
تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۱۰/۲۷، **تاریخ پذیرش:** ۱۳۸۹/۸/۹

چکیده

مقدمه: *تاکنون تقسیم‌بندی و تعیین گونه انگل لیشمانیازیس به‌طورغالب براساس مشخصات بالینی، پراکندگی جغرافیایی و گاهی اندازه انگل بوده است. باتوجه به محدودیت‌های این تقسیم‌بندی این پژوهش جهت تعیین وضعیت اپیدمیولوژیک و تعیین دقیق گونه‌های انگل براساس روش‌های مولکولی و تعیین گونه غالب انگل در مناطق آلوده استان گلستان به‌عنوان یکی از کانون‌های لیشمانیوز جلدی نوع مرطوب (روستایی) در ایران طراحی شده است.*

مواد و روش‌ها: *این پژوهش یک مطالعه توصیفی- تحلیلی می‌باشد. جامعه مورد مطالعه آن را ۶۳ بیمار دارای زخم‌های مشکوک به سالک تشکیل می‌دهند که در سال‌های ۸۳-۸۶ به آزمایشگاه‌ها و خانه‌های بهداشت روستایی مناطق آلوده استان گلستان مراجعه کرده بودند. ابزار جمع‌آوری داده‌ها، پرسش‌نامه‌ای حاوی متغیرهای دموگرافیک مانند: سن، جنس و محل سکونت و نیز متغیرهای بالینی مانند: شکل، نوع، محل، تعداد و اندازه زخم، سابقه ابتلای قبلی وجود اسکار، تعداد و محل اسکار بود. همچنین هم‌زمان با تکمیل پرسش‌نامه از نمونه زخم بیماران لام مستقیم تهیه شد و نیز نمونه‌ای جهت کشت در محیط کشت دی فازیک N.N.N (نویی، مک نیل، نیکول) تهیه گردید. پس از رشد انگل در محیط کشت، DNA انگل استخراج و سپس آزمایش‌های PCR انجام شد.*

نتایج: *رابطه آماری معناداری بین گونه لیشمانیا و قومیت و جنس وجود داشت (P<۰/۰۵)، به‌طوری‌که ۱۰۰٪ (۵۴ نفر) موارد ابتلا در قومیت ترکمن را لیشمانیا ماژور و ۱۰۰٪ (۳ نفر) موارد مبتلا در قومیت سیستانی را لیشمانیا تروپیکا تشکیل می‌دادند. در قوم فارس ۳۳/۳٪ (۲ نفر)گونه ماژور و ۶۶/۷٪ (۴ نفر)گونه تروپیکا دیده شد. اکثر بیماران، متعلق به مناطق روستایی شهرستان گنبد بودند. این بیماری در هر دو جنس دیده شد، ولی تعداد مردان مبتلا (۵۷/۱٪) بیش از زنان (۴۲/۹٪) گزارش شده است.*

نتیجه‌گیری: *این پژوهش نشان داد که گونه غالب انگل در مناطق آلوده استان گلستان لیشمانیا ماژور و بیماری لیشمانیوز جلدی آن از نوع روستایی یا مرطوب می‌باشد.*

واژه‌های کلیدی: لیشمانیوز جلدی، استان گلستان، PCR، گونه.

Original Article **Knowledge & Health 2011;6(2):26-31**

Cutaneous leishmaniasis Parasite Identification via PCR in the Infected Areas in Golestan Province

Faride Tohidi[1*], Afsane Barghae[2]
1- Instructor, Dept. of Parasitology, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran. 2- Assistant Professor, Dept. of Social Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.

Abstract:

Introduction: *Classification and identification of parasite species Leishmaniasis has been mainly based on the clinical features, geographical distribution and size of the parasite. Noting the limitations of this division, this study aimed to determine the epidemiological status and accurately determine the dominant parasite species based on molecular methods in the infected area in Golestan province as one of the foci of cutaneous leishmaniasis wet type (rural) in Iran.*

Methods: *This is a descriptive analytical study that was performed on the 63 patients suspected with ulcers of leishmaniasis and referred to the laboratories of rural health centers from 2004 to 2007. The data collection instrument was a questionnaire containing demographic variables, such as age, sex and residence as well as clinical variables such as shape, type, location, number and size of ulcers, previous history of oscar, the number and location of the scar. Along with the completion of questionnaires, direct samples from the wounds of patients and were taken and cultured in medium biphasic NNN (Novy, McNeill, Nicole).After the parasite growth in the culture ,then DNA was extracted and PCR experiments were performed.*

Results: *Statistically significant relationship was found between species of Leishmania and ethnicity and gender (P<0.05). 100% (N=54) in the Turkmen ethnicity had Leishmania major, 100% (N=3) of patients of Sistani ethnicity had leishmania tropica. The 33.3% (N=2) of Fars ethnicity patients had major species and 66.7% (N=4) had the tropica. Most patients were from rural areas of Gonbad. The disease was observed in both sexes. The number of males (57.1%) was higher than women (42.9%).*

Conclusion: *The study showed the dominant species of parasites in the infected area in Golestan Province was Leishmania major and its cutaneous leishmaniasis was of the rural type.*

Keywords: Cutaneous Leishmaniasis, Golestan province,PCR,Species.

Conflict of Interest: No
Received: 17 January 2010 Accepted: 31 October 2010
***Corresponding author:** F. Tohidi **, Email:** Tohidi66@yahoo.ca*

***نویسنده مسئول:** گرگان- بلوار هیرکان- ابتدای جاده شصت کلا- دانشگاه علوم پزشکی فلسفی- دانشکده پزشکی، **تلفن:** ۰۱۷۱-۴۴۲۱۶۵۱ **Email**: tohidi66@yahoo.ca

مقدمه

لیشمانیوز به‌صورت گسترده در مناطق مختلفی از جهان مشاهده می‌شود. این بیماری طیف وسیعی دارد که یک طرف این طیف زخمی ساده است که به‌خودی‌خود بهبود پیدا می‌کند و فقط جوشگاهی از آن باقی می‌ماند و طرف دیگر این طیف می‌تواند به‌صورت اشکال پوستی مخاطی، پوستی منتشره و یا لیشمانیوز احشایی باشد که حتی می‌تواند منجربه مرگ گردد. سالانه حدود ۳۵۰۰۰۰۰۰ نفر در سراسر دنیا در معرض این بیماری قرار دارند و دوازده میلیون نفر به این بیماری مبتلا می‌شوند (۱). به‌همین‌دلیل این بیماری یکی از ۶ بیماری مهم مناطق گرمسیری است که سازمان بهداشت جهانی، مطالعه و انجام تحقیقات درباره جنبه‌های مختلف آن را توصیه کرده است و حمایت می‌کند (۲). در ایران این بیماری به دو شکل ضایعات جلدی (سالک) و احشایی (کالازار) دیده می‌شود و در کانون‌های زیادی به‌صورت بومی وجود دارد (۳). تشخیص لیشمانیوز جلدی به‌طورمعمول براساس علائم بالینی مشاهده شده در بیماران و تأیید آن ازطریق آزمایش مستقیم، کشت یا بیوپسی صورت می‌گیرد (۴). تشخیص انواع مختلف لیشمانیا از روی شکل امکان‌پذیر نمی‌باشد. بیماری‌زایی گونه‌های مختلف لیشمانیا به نوع و حدت انگل و خصوصیات میزبان بستگی دارد. در گذشته تقسیم‌بندی انگل از روی مشخصات بالینی، پراکندگی جغرافیایی و گاهی اندازه انگل بوده است. امروزه این معیارها چندان قابل قبول نیست و تعیین مشخصات دقیق و علمی لیشمانیاها ضروری است. در چند سال اخیر معیارهایی مانند آنالیز DNA، آنتی‌بادی‌های منوکلونال و الگوهای ایزوآنزیمی مورد استفاده وسیع قرار گرفته‌اند (۵ و ۶). در ایران، چند استان کانون بومی هر دو نوع لیشمانیوز جلدی نوع شهری و روستایی می‌باشند. استان گلستان همیشه به‌عنوان یکی از کانون‌های لیشمانیوز جلدی نوع مرطوب (روستایی) مطرح بوده است که تاکنون تقسیم‌بندی و تعیین گونه انگل در آن از روی مشخصات بالینی، پراکندگی جغرافیایی و گاهی اندازه انگل بوده است و مطالعات اندکی جهت تعیین گونه انگل در این استان صورت گرفته است. برای مثال نظری و همکاران (۷) براساس مخازن حیوانی و مشخصات بالینی زخم‌ها، گونه لیشمانیا ماژور یا لیشمانیوز جلدی روستایی را گونه غالب در منطقه مینودشت استان گلستان مطرح نموده‌اند. ازآنجایی‌که روش‌های مولکولی مانند PCR از دقت بالاتری در تعیین گونه‌ها برخوردارند، این پژوهش با هدف تعیین دقیق گونه انگل لیشمانیا براساس روش‌های مولکولی و تعیین گونه غالب این انگل در مناطق آلوده استان گلستان، طراحی شده است. امید است که نتایج این مطالعه بتواند در تعیین دقیق گونه انگل، کنترل مخازن، تشخیص و درمان سریع‌تر بیماران و درنهایت کنترل و حذف این بیماری انگلی در استان کمک‌کننده باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه، توصیفی- تحلیلی است و نمونه‌گیری آن به‌صورت غیراحتمالی و به روش آسان انجام شده است. جمعیت مورد پژوهش، بیماران مشکوک به سالک مراجعه‌کننده به آزمایشگاه‌ها و خانه‌های بهداشت مناطق آلوده استان گلستان از سال ۸۳- ۸۶ می‌باشند. از زخم بیماران نمونه‌گیری می‌شد و مقداری از نمونه با رعایت شرایط استریلیزاسیون وارد لوله محتوی محیط کشت N.N.N می‌گردید. برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها ۲۵۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین به محیط افزوده می‌شد و نمونه‌ها در ^{oc}۲۴ انکوبه می‌شدند. هر ۲- ۳ روز یک‌بار محیط کشت‌ها ازنظر پروماستیگوت‌ها کنترل می‌شدند. علاوه‌بر کشت، از هر بیمار ۲ اسمیر مستقیم بر روی لام تهیه و پس از تثبیت با الکل متیلیک و رنگ‌آمیزی گیمسا ازنظر میکروسکوپی نیز بررسی می‌شدند. چند روز بعد از انتقال ترشحات زخم حاوی انگل به محیط کشت N.N.N، توسط میکروسکوپ وضعیت رشد انگل بررسی می‌شد. بعد از اطمینان از عادت‌کردن انگل به محیط و تکثیر آن، حدود ۱ml از قسمت مایع محیط در شرایط استریل به کمک یک سرنگ به بطری شیشه‌ای حاوی ^{cc}۱۰ محیط کشت RPMI 1640 منتقل می‌گردید. ۲- ۳ روز بعد از رشد انگل، محیط کدورت پیدا می‌کرد و دچار تغییر رنگ می‌شد. بعد از اطمینان از رشد کافی انگل (انگل ۱۰۶< انگل در هر میلی‌لیتر) و عدم‌آلودگی، اقدام به شستشو با محلول فسفات بافر سالین (PBS) و جداسازی انگل می‌شد (۸). سپس DNA انگل به‌روش P.C.I Extraction (فنل-کلروفرم-ایزوآمیل الکل) استخراج می‌گردید. پس از الکتروفورز DNA استخراجی روی ژل ۱٪ و تخمین میزان DNA، PCR انجام می‌گردید (۹، ۱۰ و ۱۱).

در روش PCR از یک جفت پرایمر ذیل استفاده شد:

Forward: 5'-CAACACGCCGCCTCCTCTCT-3'
Reverse: 5'-CCTCTCTTTTTTCTCTGTGC-3'

توالی‌هایی به طول ۴۸۵، ۵۶۵ و ۶۲۶ جفت باز به‌ترتیب برای گونه‌های لیشمانیا تروپیکا، لیشمانیا اینفانتوم و لیشمانیا ماژور تکثیر گردید. تفکیک این گونه‌ها براساس اندازه آن‌ها امکان‌پذیر است. پرایمرها از بخش ITS (Internal-Transcribed-Spacer) طراحی شدند.

برنامه حرارتی ارائه‌شده به ترموسایکلر برای ITS-PCR مطابق این دستورالعمل بود:

۱ سیکل ^{oc}۹۴، ۵ دقیقه- ۳۰ سیکل ^{oc} ۳۰، ۹۴ دقیقه- ^{oc}۶۲، ۳۰ دقیقه- ^{oc}۷۲، ۴۵ دقیقه- ۱ سیکل ^{oc}۷۲، ۵ دقیقه.

برای مطالعه باندهای محصول PCR از ژل الکتروفورز به میزان ۱/۵٪ در بافر TAE استفاده شد.

سوش‌های استاندارد استفاده‌شده شامل این موارد بودند:

Leishmania Major: MHOM/IR/75/ER

Leishmania Tropica: MHOM/IR/02/Mash10
Leishmania Infantum: MCAN/IR/97/LON 490

در این قسمت با استفاده از تنوع ژن‌های ناحیه Non Coding Transcribed مربوطبه rDNA در گونه‌های مختلف انگل لیشمانیا و پرایمر طراحی شد. به‌جهت تعیین گونه انگل لیشمانیای جداشده از ضایعات جلدی، روش ITS-PCR برای تکثیر قطعات ITS1، ITS2 استفاده شد. در این روش و با این‌گونه پرایمرها، گونه‌های لیشمانیا تروپیکا با یک یا حداکثر ۲ باند کمتر از ۵۰۰bp (bp ۴۵۰–۴۰۰) و گونه لیشمانیا ماژور با یک باند بیشتر از ۶۰۰ bp (bp ۷۰۰–۶۰۰) و گونه لیشمانیا اینفانتوم با ایجاد ۲ باند اختصاصی بیشتر از ۵۰۰ bp و ۷۰۰ bp از یکدیگر قابل تفکیک می‌باشند.

علاوه‌بر آزمایش‌های اختصاصی مانند لام، کشت و PCR، برای هر بیمار پرسش‌نامه‌ای حاوی اطلاعات دموگرافیک مانند: سن، جنس، محل سکونت و نیز اطلاعات بالینی مانند: شکل، نوع، تعداد، اندازه و محل زخم، سابقه ابتلای قبلی، وجود اسکار، محل و تعداد اسکار تکمیل گردید. بعد از جمع‌آوری داده‌ها و ورود به رایانه، تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون کای دو انجام شد.

نتایج

در این پژوهش از ۶۳ نمونه، ۵۶ نمونه (۹۳/۶٪) گونه لیشمانیا ماژور و ۷ نمونه (۶/۴٪) گونه لیشمانیا تروپیکا بودند. توزیع گونه لیشمانیا برحسب متغیرهای زمینه‌ای در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- توزیع فراوانی گونه‌های لیشمانیوز جلدی برحسب متغیرهای سن، جنس، قومیت و شهرستان محل سکونت

متغیر	ماژور	تروپیکا	جمع
	تعداد (٪)	تعداد (٪)	
سن			
<۵	۲۰ (۹۵/۲)	۱ (۴/۸)	۲۱
۹–۵	۱۱ (۸۴/۶)	۲ (۱۵/۴)	۱۳
۱۹–۱۰	۱۳ (۹۲/۹)	۱ (۷/۱)	۱۴
۲۹–۲۰	۵ (۸۳/۳)	۱ (۱۶/۷)	۶
≥۳۰	۷ (۷۷/۸)	۲ (۲۲/۲)	۹
جنس			
مذکر	۳۱ (۸۶/۲)	۵ (۱۳/۹)	۳۶
مؤنث	۲۵ (۹۲/۶)	۲ (۷/۴)	۲۷
قومیت			
فارس	۲ (۳۳/۳)	۴ (۶۶/۷)	۶
ترکمن	۵۴ (۱۰۰)	۰ (۰)	۵۴
سیستانی	۰ (۰)	۳ (۱۰۰)	۳
شهرستان محل سکونت			
گنبد	۵۴ (۹۴/۷)	۳ (۵/۳)	۵۷
علی‌آباد	۲ (۳۳/۳)	۴ (۶۶/۷)	۶

همان‌طور که ملاحظه می‌شود، در کلیه گروه‌های سنی و نیز در هر دو جنس، گونه لیشمانیا ماژور بیشتر از لیشمانیا تروپیکا می‌باشد. بیشترین گونه لیشمانیا ماژور در بین قوم ترکمن دیده شده است. شهرستان گنبد آلوده‌ترین منطقه استان گلستان ازنظر بیماری لیشمانیوز جلدی است که گونه انگل در این مناطق، لیشمانیا ماژور می‌باشد.

۸۳/۳٪ از منازل مبتلایان به گونه ماژور و ۱۶/۷٪ از منازل مبتلایان به گونه تروپیکا، آلوده به جوندگان بودند و موش‌ها به‌راحتی در این منازل رفت‌وآمد می‌کردند.

در این مطالعه ۴۹/۲٪ (۳۱ نفر) مسافرت‌هایی به اطراف استان و به‌خصوص مناطق مرزی و آلوده داشتند و ۵۰/۸٪ (۳۲ نفر) از مبتلایان از منطقه محل سکونت خود خارج نشده بودند. در بین افرادی که سابقه مسافرت داشتند، بیش‌ترین فصل مسافرت تابستان با ۳۸/۱٪ و کم‌ترین آن فصل پاییز با ۹/۵٪ بود.

در جدول ۲ توزیع محل زخم بیماران ذکر شده است. ۱۲/۷٪ (۸ نفر) دارای اسکار و سابقه ابتلای قبلی به سالک و زخم فعال بودند درحالی‌که ۸۷/۳٪ (۵۵ نفر) فقط زخم فعال داشتند. بیشترین محل اسکار، پا (۸٪) و کمترین محل آن، صورت (۱/۶٪) بود.

در این مطالعه زخم‌ها بیشتر در پا (۳۱/۷٪) دیده شدند (جدول ۲). لازم به ذکر است که برخی از افراد مورد بررسی در چند عضو از بدنشان زخم یا زخم‌هایی داشتند.

در این مطالعه ۷۹/۴٪ از شرکت‌کنندگان زخم مرطوب و ۲۰/۶٪ زخم خشک داشتند. ۳۹/۷٪ از افراد یک زخم، ۳۸٪ از آنان ۲- ۶ زخم و ۲۲/۳٪ بیش از ۶ زخم داشتند. ۶۰/۳٪ از افراد در این مطالعه برای درمان، دارو مصرف کرده بودند و ۳۹/۷٪ از آنان بدون دارودرمانی بودند.

شکل ۱، باندهای اختصاصی ایجادشده توسط ۶ نمونه به‌دست‌آمده از بیماران همراه با گونه‌های استاندارد لیشمانیا ماژور، لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا اینفانتوم را در کنار 100 bp DNA Ladder Marker نشان می‌دهد.

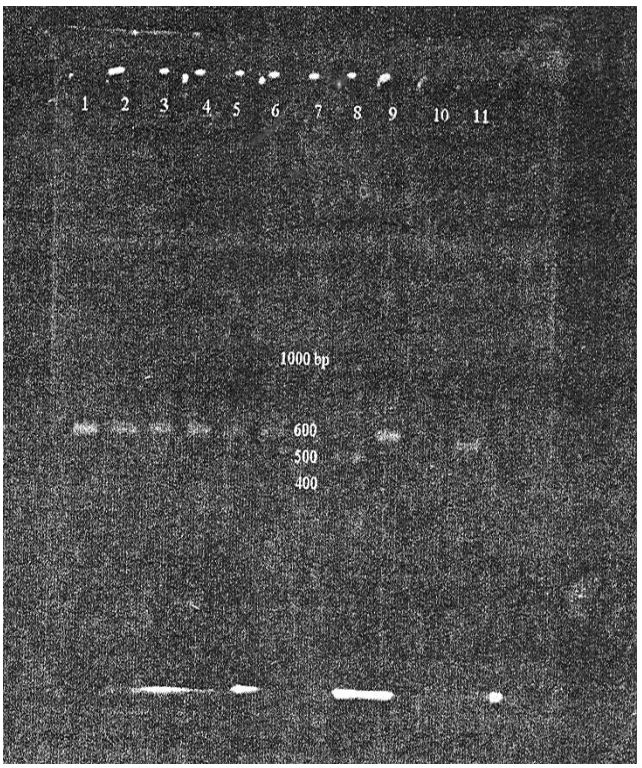
جدول۲- توزیع فراوانی لیشمانیوز جلدی برحسب محل زخم

محل زخم	تعداد	درصد
پا	۲۰	۳۱/۷
دست	۱۱	۱۷/۵
صورت	۶	۹/۵
سایر نقاط بدن	۲۶	۴۱/۵

بحث

در این مطالعه، تعداد مردان مبتلا به این بیماری بیشتر از زنان بود. این یافته با نتایج مطالعات انجام‌شده‌ی مهاجری در مشهد (۱۲)، رجبی در اصفهان (۱۳)، سیلویرا در برزیل (۱۴) و توحیدی در مشهد (۱۵) مطابقت دارد. در تمامی این مطالعات، درصد مبتلایان مرد بیشتر از زن بوده است. یکی از دلایل بالابودن ابتلا در مردان نسبت‌به زنان را می‌توان ناشی از پوشش نسبتاً کامل زنان دانست. همچنین وجود عاداتی چون خوابیدن در فضای باز در میان مردان و تماس بیشتر آنان با عوامل محیطی به دلایل شغلی را می‌توان از سایر علت‌های افزایش ابتلا در این جنس دانست.

در مطالعات مختلف دیگری نیز درصد ابتلا به بیماری لیشمانیوز جلدی در گروه‌های مختلف سنی بررسی شده است. در مطالعه حمزوی (۱۶)، یعقوبی ارشادی در یزد (۱۷)، سلیمانی (۱۸) و گورل (۱۹) بالاترین درصد ابتلا در گروه سنی ۵- ۹ سال گزارش شده است. همچنین بیشترین گروه سنی مبتلا در مطالعه یعقوبی ارشادی در شهر نیک‌آباد و روستاهای تابعه آن ۰- ۴ سال (۱۷) و در شهر اردستان ۱۰- ۱۴ سال (۲۰) در مطالعه صدقیانی بالای ۲۵ سال (۲۱)، در مطالعه صادقی‌نژاد (۲۲) ۲۰- ۲۹ سال و در مطالعه اوزون (۲۳) ۱۰- ۱۹ سال بوده است. طبق نتایج حاصل از مطالعه ما، بیشترین تعداد بیماران مربوطبه گروه سنی کمتر از ۵ سال و کم‌ترین تعداد بیماران در گروه سنی ۲۰- ۲۹ سال بودند. به‌طورکلی با مقایسه نتایج مطالعات متعدد، می‌توان این‌گونه استنباط نمود که بروز و شیوع در گروه‌های سنی مختلف بستگی به کانون‌های مختلف دارد و توزیع سنی با بومی‌بودن بیماری مرتبط است. در اکثر مطالعات انجام‌شده، کاهش تعداد مبتلایان در سنین بالا مشاهده می‌گردد که این موضوع ایجاد ایمنی را در سالک با جدیت بیشتری مطرح می‌کند. در بررسی بیماران به تفکیک محل ضایعات، بیشترین تعداد بیماران در ناحیه پاها ۳۱/۷٪ ضایعه داشتند. ضایعات لیشمانیوز جلدی معمولاً در نقاط برهنه و در معرض دید بدن، بیشتر ظاهر می‌شوند؛ لذا بسته به آداب و رسوم و نحوه لباس پوشیدن ساکنان مناطق مختلف و عادات خون‌خواری پشه خاکی، اندام‌هایی که بیش‌ترین ضایعات سالکی را دارند، در نقاط مختلف دنیا و حتی یک کشور، باهم تفاوت دارد. در گزارش غروی عنوان شده است که در لیشمانیوز نوع خشک، ضایعات غالباً روی صورت و در نوع مرطوب، بیشتر روی دست و پا می‌باشند (۱). در این تحقیق بیشترین تعداد ضایعات، یک ضایعه بود که در ۳۹/۷٪ موارد دیده شد و با نتایج مطالعه درودگر (۲۴) در شمال غرب کاشان که ۴۴/۸٪ بیماران دارای یک ضایعه بودند مشابهت دارد و به‌نظرمی‌رسد تعدد ضایعات ممکن است براثر دریافت نیش‌های آلوده در زمان‌های مختلف یا براثر تلقیح خودبه‌خود ناشی‌از خاراندن باشد (۳).



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR
Lane 1,2,3,4,5,6: گونه لیشمانیا ماژور
Lane 7: کنترل منفی
Lane 8: مارکر100bp
Lane 9: استاندارد لیشمانیا ماژور
Lane 10: استاندارد لیشمانیا ترواپیکا
Lane 11: استاندارد لیشمانیا اینفانتوم

از ۶۳ بیمار مورد مطالعه، ۸ نفر (۱۲/۷٪) دارای اسکار به‌جا مانده از ابتلای قبلی بودند. ابتلا به بیماری لیشمانیوز مصونیت کامل ایجاد می‌کند؛ یعنی کسی که یک‌بار به این بیماری مبتلا شده است دیگر به آن مبتلا نمی‌شود، اما ممکن است جسم لیشمن در بدن باقی مانده باشد و هرگاه سیستم ایمنی تضعیف گردد، جای زخم قبلی دوباره زخم می‌شود. از ۶۳ بیمار مورد مطالعه ۵۰ نفر (۷۹/۴٪) زخم مرطوب و ۱۳ نفر (۲۰/۶٪) زخم خشک داشتند. این یافته با نتایج مطالعه نظری و همکاران مطابقت دارد (۷). در این مطالعه انگل لیشمانیا از ۶۳ نمونه از بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی ساکن روستاهای مرزی جدا شد که با استفاده از تنوع ژن‌های ناحیه Non Coding Transcribed مربوط به DNA Ribosomal و پرایمر طراحی‌شده مربوطبه قطعات ITS1 و ITS2 از روش ITS-PCR گونه غالب در این منطقه لیشمانیا ماژور تعیین گردید که این نتایج به‌خوبی لیشمانیوز جلدی روستایی را در منطقه تأیید می‌کند. نتایج مطالعه نظری و همکاران در منطقه مینودشت استان گلستان، با استفاده از روش‌های مولکولی، نشان داد

که گونه غالب این انگل در این ناحیه لیشمانیا ماژور است و علت عمده آلودگی در این منطقه، رفت‌وآمد مردم به روستاهای هم‌مرز با کشور ترکمنستان می‌باشد. ازطرفی باتوجه به موقعیت جغرافیایی این روستاها، وجود مناطق کوهستانی و لانه‌های متعدد جوندگان و نیز نوع مصالحی که در ساختمان خانه‌ها و طویله‌ها و مرغداری‌ها به‌کاربرده شده، محل مناسبی را برای تکثیر پشه خاکی فراهم نموده است. همچنین نزدیکی انسان‌ها با دام از مواردی است که ابتلا به لیشمانیوز جلدی را در این ناحیه افزایش داده است. ۴ نمونه جداشده، افراد مبتلا به گونه لیشمانیا تروپیکا بودند. البته افراد مبتلا به این گونه، مهاجرانی بودند که در فصول بهار و تابستان به شهرهای شاهرود، دامغان و سمنان سفر کرده و در کوره‌های آجرپزی این شهرها مشغول به‌کار بوده‌اند. با اینکه گونه غالب در استان سمنان نیز لیشمانیا ماژور ذکر شده است، اما ممکن است این افراد باتوجه به تنوع گونه در استان سمنان، در این مناطق آلوده‌شده باشند و پس از آلوده شدن به استان گلستان بازگشته باشند. لذا تصور بر این است که این گونه وارداتی از استان سمنان می‌باشد؛ در این مطالعه مانند سایر کانون‌های لیشمانیوز جلدی روستایی، بیشترین موارد بیماری در فصل پاییز و ماه‌های آبان و آذر بوده است که این یافته با نتایج مطالعه نظری و همکاران مطابقت دارد (۷). انگل‌شناسان معتقدند که مخزن لیشمانیا ماژور جوندگانی مانند موش‌ها می‌باشند، درحالی‌که مخزن لیشمانیا تروپیکا انسان و سگ است. نتایج این پژوهش هم این نکته را تأیید می‌کند. باتوجه به غالب‌بودن گونه لیشمانیا ماژور در این منطقه و به این دلیل که مخزن این بیماری جوندگان هستند، به‌نظرمی‌رسد مراکز بهداشتی با سم‌پاشی مداوم علیه جوندگان در روستاهای گنبد و مناطق مرزی، بتوانند نقش مؤثری در کاهش موارد بیماری لیشمانیوز جلدی در این منطقه داشته باشند.

درمجموع نتایج این پژوهش نشان داد که گونه غالب انگل در مناطق آلوده استان گلستان لیشمانیا ماژور است و بیماری لیشمانیوز جلدی غالب در این منطقه از نوع روستایی یا مرطوب می‌باشد. بیشترین مبتلایان به این بیماری در سنین کمتر از ۵ سال هستند و تعداد مردان مبتلا بیشتر از زنان می‌باشد. محل زخم‌ها و محل اسکار نیز بیشتر در پا دیده شده است. روستاهای گنبد آلوده‌ترین مناطق استان بودند. به‌لحاظ قومیت، این بیماری در قوم ترکمن به‌دلیل زندگی در مناطق مرزی و رفت‌وآمد به کشورهای مرزی مانند ترکمنستان بیشتر دیده شد و نیز علائم بالینی با آزمایش‌های تشخیصی مطابقت کامل داشتند.

References

1. Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. J of Clinical Microbiology 2006;44(4):1435-1439.
2. WHO. Control of the Leishmaniasis. Report of WHO Expert Committc. Tech Rep Ser 1990;793:130-133.
3. Gharavi MJ. Leishmaniasis. Clinical Protozoology. 3nd ed, Tabib 2004;190-245.[Persian].
4. Ihalamulla RL, Rajapaksa US, Karunaweera ND. Microculture for the isolation of leishmania modified to increase efficacy: a follow-up to a previous study. Ann Trop Med Parasitol 2006;100(1):87-89.
5. Hatam GR, Ardehali S, Motazedian MH, Sadjjadi SM, Fakoorziba MR. The methods of isolation and characterization of leishmania parasite. Shiraz: Loza press;2005.[Persian].
6. Edrissian GH, Rezaeian M, Ghorbani M, Keshavarz H, Mohebali M. Medical protozoology. 1nd ed Tehran University of Medical Sciences 2007:250-277.[Persian].
7. Nazari F. Survey of cutaneous leishmaniasis and determination of reservoir in Minoodasht of Golestan province [dissertation]. Tehran University of Medical Sciences. Health Faculty 1999.[Persian].
8. Tohidi F, Kazemi B, Abaszadegan MR. Cloning of leishmania pteridine reductase gene. Proceeding of the 4th National Iranian Congrees of Parasitology Parasitology & Parasite Diseases. Mashhad University of Medical Sciences 2003.[Persian].
9. Saunders GC,Parkers HC.Analytical Molecular Biology(Quality and Validation). Uk:Trowbridge,Wiltshire;1999.
10. Piarroux R, Gambareli F, Dumon H, Fontes M, Dunan S, Mary C, et al. Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myloculture and serology for diagnosis of visceral Leishmaniasis in immunocom promised Patients. J Clin Microbiol .1994;32(3):746-749.
11. Marin f, Garcia J, Penarrubia MPG, Penalver J. Cultivation of leishmania: Comparison of different media for promastigote cultivation. Ann Trop Med Parasitol 1982;76(6):607-613.
12. Mohajeri M, Bolorsaz M, Shamsian SAA. Prevalence of cutaneous Leishmaniasis in secondery school students in Mashhad, Iran. Journal of Mashhad University of Medical Sciences 2001;44(72):54-60.[Persian].
13. Rajabi P. Comparison between two sampling FNAC and scraping in microscopic diagnosis of cutaneous leishmaniasis. J of Research in Medical Sciences;4(1):3-6.[Persian].
14. Silveira T.G, Arraes SM, Bertolini DA, Teodoro U, Lonardoni MV, Roberto AC, et al. The laboratory diagnosis and epidemiology of cutaneous leishmaniasis in parana state, southern Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 1999;32(4):413-23.
15. Tohidi F,Kazemi B,Mohajery M. Survey epidemiological status of cutaneous Leishmaniasis in Mashhad. Proceeding of 5th National Iranian Congress of Parasitology;Tehran:Iran
16. Hamzavi Y, Mohebali M, Edrisian GH, Foruzani A. An epidemiological study of cutaneous Leishmaniasis (human being and animal reservoir) in dashtestan and dashti districts, Bushehr Province, Iran, 1998-99. Iranian Journal of Public Health 2000;1 (29):177-190.[Persian].
17. Yaghoobi Ershadi MR, Jafari R. An epidemiological study of cutaneous leishmaniasis in Nikabad town. Proceeding of 3th National Iranian Congress of Parasitology; Sari, Iran. Mazenderan University of Medical Sciences;2000.[Persian].
18. Soleimani M, Shahi M, Madani A. Study of cutaneous leishmaniasis in Hormozgan province (1999). Proceeding of 3th National Iranian Congress of Parasitology; Sari, Iran. Mazenderan University of Medical Sciences;2000.[Persian].
19. Gurel MS, Ulukanligil M, Ozbilge H. Cutaneous Leishmaniasis in sanliufa: epidemiologic and clincal features of the last four years 1997-2000. Int J Dermatol 2002;41(1):32-7.
20. Yaghoobi Ershadi MR, Hanafi AA, Akhavan AA, Zahraei Ramazani AR, Mohebali M. Cutaneous leishmaniasis in Ardestan town. Hakim Research Journal 1999;3(1):206-214.[Persian].

21. Sedghiyani SH, Hanafi Bejed AA, Mehdipoor D. The study of cutaneous leishmaniasis in patients reffered to medical of center in Tehran south (1998-1999). Proceeding of 3rd National Iranian Congrees of Parasitology; Sari, Iran. Mazenderan University of Medical Sciences;2000.[Persian].

22. Sadeghinejad B. The Survey of cutaneous leishmaniasis in patients referred to medical of center in khozestan province (1998-1999). Proceeding of 3rd National Iranian Congress of Parasitology;Sari, Iran. Mazandaran University of Medical Sciences;2000.[Persian].

23. Uzun S, Uslular C,Yucel A, acar MA, Ozpoyraz M, Memisoglu HR. Cutaneous leishmaniasis: evaluation of 3074 cases in the cukurova region of Turkey. Br J Dermatol 1999;140(2):347-50.

24. Doroodgar A, Mahbobi S, Nemetian M, Sayyah M, Doroodgar M. An epidemiological study of cutaneous Leishmaniasis in Kashan (2007-2008). Koomesh 2009;10(3):177-184.[Persian].

25. Sharifi I, Ardehali S, Motazedian MH. Diagnosis, identification and characterization of leishmania isolates in school children in Bam, southeastern Iran. Iranian J Medical Sciences 1997;23(1&2):82-88.

26. Daneshvar Farzanegan P, Baghaei M, Janghorbani M, Karimi J. The survey of cutaneous leishmaniasis in patients reffered to medical of center in barkhar and myme, Isfahan, Iran (1998-2000). Proceeding of 10th National Iranian Congress of Infection and Tropical Diseases. Tehran 2001.[Persian].