مجله دانشکده پزشکی اصفهان **مقاله پژوهشی**
سال سی‌ام/شماره ۲۰۹/هفته سوم آذرماه ۱۳۹۱
تاریخ دریافت: ۹۱/۶/۱۵ **تاریخ پذیرش:** ۹۱/۸/۱۴

تعیین گونه‌ی عامل لیشمانیوز جلدی و بررسی دوره‌ی بهبود ضایعات در بیماران مراجعه‌کننده به مرکز تحقیقات بیماری‌های پوستی و سالک صدیقه‌ی طاهره (س) اصفهان

دکتر سید حسین حجازی[۱]، نوشین هاشمی[۲]، میترا هاشمی[۳]، نرگس عبدیان[۴]، لیلا شفیعی[۵]، دکتر سیروس هاشمی[۶]، دکتر محمدعلی نیلفروش‌زاده[۷]

چکیده

مقدمه: لیشمانیوز بیماری عفونی انگلی با انتشار وسیع در مناطق معتدله و گرمسیری است. آنتی‌موان‌ها خط اول درمان لیشمانیوز جلدی در ایران و بسیاری از نقاط دنیا می‌باشند. پیش‌آگهی بیماری با توجه به گونه عامل بیماری مختلف است و انتخاب دارو با گونه‌ی عامل بیماری ارتباط دارد. هدف از این مطالعه، تعیین گونه‌ی عامل لیشمانیوز جلدی و بررسی زمان بهبود کامل ضایعات با توجه به گونه‌ی عامل بیماری بود.

روش‌ها: در این مطالعه تعیین گونه‌ی انگل Leishmania جدا شده از بیماران با استفاده از DNA استخراج‌شده‌ی حاصل از کشت با روش PCR-RFLP (Polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism) انجام شد. بیماران توسط پزشک معاینه شدند و روند التیام بالینی آن‌ها بعد از یک دوره‌ی درمانی با گلوکانتیم مورد بررسی دقیق قرار گرفت و در پرونده‌ی بیمار ثبت گردید.

یافته‌ها: از مجموع ۲۰ نمونه‌ی جداشده، همه‌ی نمونه‌ها *Leishmania major* تشخیص داده شدند. میانگین دوره‌ی بهبود کامل در مبتلایان به لیشمانیوز جلدی مرطوب ۵۸ روز به دست آمد.

نتیجه‌گیری: میانگین دوره‌ی بهبود در بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی خشک طولانی‌تر از بیماران لیشمانیوز جلدی مرطوب می‌باشد.

واژگان کلیدی: تعیین گونه، PCR-RFLP، لیشمانیوز جلدی، دوره‌ی بهبود کامل

مقدمه

لیشمانیوز مجموعه‌ای از بیماری‌های عفونی است که به وسیله‌ی گونه‌های مختلف تک‌یاخته‌ی Leishmania ایجاد می‌شود و ناقل آن پشه‌های خاکی فلبوتومینه می‌باشد (۳-۱). این بیماری در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری شایع است. ۹۰ درصد از گزارش‌های مرتبط با لیشمانیوز مربوط به کشورهای افغانستان، الجزایر، برزیل، ایران، عربستان سعودی می‌باشد (۴). اپیدمیولوژی و اکولوژی بیماری بسیار متنوع است و به عوامل متعددی مانند انگل، ناقل، میزبان و محیط بستگی دارد. در ایران نوع آنتروپونوتیک یا نوع شهری لیشمانیوز جلدی (Cutaneous leishmaniasis یا CL) اغلب در شهرهای تهران، شیراز، خراسان و کرمان و نوع

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دکتری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

[۱] دانشیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های پوست و سالک و گروه انگل و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۲] دانشجوی دکتری، گروه انگل و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[۳] کارشناس ارشد، گروه آمار، معاونت پژوهشی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[۴] دانشجوی دکتری، گروه انگل و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۵] کارشناس ارشد، گروه انگل و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۶] دندان‌پزشک، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[۷] دانشیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های پوست و سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: نوشین هاشمی
Email: nooshin_hashemi61@yahoo.com

روستایی در اصفهان، گلستان، خوزستان، ایلام، بوشهر و سمنان دیده می‌شود (۶-۵).

در زمان‌های گذشته تعیین گونه‌ی Leishmania به طور عمده بر اساس علایم بالینی و منطقه‌ی جغرافیایی انجام می‌شد. تشخیص بر این اساس با توجه به مطالعات انجام شده و گزارش تنوع گونه‌ها از یک منطقه‌ی خاص جغرافیایی قابل اعتماد نمی‌باشد (۷). سال‌ها آزمایشات مستقیم میکروسکوپی روش استاندارد در تشخیص لیشمانیوز جلدی بوده است. این روش به نسبت ساده و ارزان است، اما از نظر حساسیت فاقد کارایی روش‌های مولکولی می‌باشد. به خصوص این که توان جداسازی گونه‌های مختلف لیشمانیاهای عامل لیشمانیوز جلدی را ندارد (۹-۸). روش‌های سرولوژی نیز به علت واکنش‌های متقاطع بین آنتی‌ژن و تعدادی از میکروارگانیسم‌ها فاقد حساسیت کافی هستند و اغلب در اشکال لیشمانیوز جلدی این روش‌ها کاربردی ندارند (۱۰). در سالیان اخیر روش‌های نوین مولکولی مبتنی بر تکنیک‌های PCR-RFLP (Polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism) جهت تعیین هویت ایزوله‌های لیشمانیا استفاده گردیده است. با کمک این روش‌ها که از حساسیت و اختصاصیت بالاتری نسبت به روش‌های سنتی برخوردار هستند، به راحتی می‌توان گونه‌های انگل را در کوتاه‌ترین زمان تعیین هویت کرد (۱۱).

درمان بیماری بسته به نوع انگل متفاوت است و تعیین مشخصات انگل به منظور برنامه‌ریزی کنترل، پیشگیری و درمان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. ترکیبات آنتی‌موان خط اول درمان CL هستند که دو ترکیب آن یعنی مگلومین آنتی‌مونات (گلوکانتیم) و سدیم استیبو گلوکونات (پنتوستام) از نظر تجاری در دسترس می‌باشند. گلوکانتیم از ترکیبات ۵ ظرفیتی آنتی‌موان و از متداول‌ترین داروهایی است که جهت درمان CL در ایران و سایر نقاط دنیا استفاده می‌شود. املاح آنتی‌موان برای اولین بار در درمان شیستوزومیاز استفاده شدند. این دارو به صورت داخل عضلانی (Intramuscular) و داخل ضایعه‌ای (Intralesional) تزریق می‌شود (۱۲، ۲).

هدف از این مطالعه، تعیین گونه‌ی عامل لیشمانیوز جلدی و بررسی دوره‌ی بهبود کامل ضایعات در بیماران مبتلا به این بیماری که به مرکز تحقیقات بیماری‌های پوستی صدیقه‌ی طاهره (س) اصفهان مراجعه کردند، بود.

روش‌ها

این مطالعه از نوع مقطعی بود که در شهر اصفهان از شهریور ۱۳۸۷ تا تیر ۱۳۸۸ انجام گردید. نمونه‌ها از آزمایشگاه مرکز تحقیقات بیماری‌های پوستی و سالک صدیقه‌ی طاهره (س) اصفهان که از مراکز پذیرش بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی می‌باشد، تهیه شد.

برای انجام نمونه‌گیری و کشت ابتدا محل ضایعه با اتانول ۷۰ درصد ضد عفونی شد و برش کوچکی در حاشیه‌ی برجسته‌ی زخم به وسیله‌ی تیغ جراحی یک بار مصرف ایجاد شد. مقداری از بافت همراه با سروزیته، از موضع ضایعه برداشته شد و بر روی لام گسترش تهیه گردید.

اسمیرهای تهیه شده بر روی لام‌ها در مقابل هوا خشک شدند و با متانول چند دقیقه فیکس گردید. برای رنگ‌آمیزی از رنگ گیمسا استفاده شد. لام‌های رنگ‌آمیزی شده زیر میکروسکوپ با لنز × ۴۰ مورد بررسی اولیه و لنز روغنی × ۱۰۰ جهت مشاهده‌ی اشکال

آماستیگوت انگل آزمایش شد. جهت کشت نمونه‌ها مقداری از نمونه‌های مشکوک به طور استریل به محیط کشت NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) برده شد و در دمای ۱ ± ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه و هر ۳ روز از نظر وجود پروماستیگوت‌ها بررسی گردید. پس از ایزوله شدن پروماستیگوت‌ها به منظور تولید انبوه به محیط RPMI ۱۶۴۰ (Roswell Park Memorial Institute) همراه با سرم جنین گوساله به عنوان مکمل انتقال یافت.

سپس DNA از پروماستیگوت‌های تکثیر شده پس از سه بار شستشو با PBS استریل، با استفاده از کیت High pure PCR template preparation (Roche) استخراج شد و بر روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز و بررسی شد.

برای تعیین گونه‌ی ایزوله‌های DNA استخراج شده ابتدا ایزوله‌ها با استفاده از دو پرایمر زیر که مربوط به ناحیه‌ی ITS1 هستند در دستگاه ترموسایکلر تکثیر شدند. توالی پرایمرها به شرح زیر بود (۱۳):

پرایمر ۱:

L ITS R 5'-CTG GAT CAT TTT CCG ATG 3

و پرایمر ۲:

'L 5.8 S 5'-CTG GAT CAT TTT CCG ATG 3

برای انجام PCR از DNA استخراج‌شده‌ی گونه‌های استاندارد *L. major* (MRHO/IR/75/ER) و *L.tropica* (MH/IR/yazd1) به عنوان شاهد مثبت استفاده شد.

حجم واکنش PCR ۲۵ میکرولیتر. Template DNA (۱ میکرولیتر)، پرایمرها (هر یک ۲۵ پیکومول)، $MgCl_2$ (۲ میکرومول)، Taq polymerase enzyme (۰/۵ واحد) و dNTP (۲۰۰ میکرومول) مواد تشکیل‌دهنده‌ی واکنش بودند که در یک میکروتیوب ۰/۲ میلی‌لیتری مخلوط شدند و در ترموسایکلر قرار گرفتند.

مراحل انجام PCR به ترتیب زیر انجام شد:

یک سیکل مقدماتی دناتوره کردن با دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۰ سیکل و هر سیکل شامل:

۱) ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه (Denaturation)

۲) ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (Annealing)

۳) ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه

۴) ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۶ دقیقه

محصول تکثیرشده بر روی ژل آگاروز ۱ درصد با افزودن Loading buffer الکتروفورز شد.

برای انجام واکنش هضم (Digestion) با آنزیم Hae III، این آنزیم همراه بافر و آب مقطر از شرکت فرمنتاز (Fermentase) خریداری شد.

ddH2O (۷/۵ میکرولیتر)، Hae III (۱۰ میکرولیتر)، Buffer ۱۰X (۵ میکرولیتر)، ITS-rRNA (۵ میکرولیتر) مواد تشکیل‌دهنده‌ی واکنش هضم بودند. این مواد با هم مخلوط شدند و میکروتیوب در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت قرار گرفت.

مشاهده‌ی باندها بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد با افزودن Loading buffer انجام شد.

علاوه بر تعیین گونه‌ی لیشمانیا پیگیری روند التیام زخم نیز انجام شد. بیماران مورد مطالعه توسط پزشک معاینه شدند و روند التیام بالینی آن‌ها بعد از یک دوره‌ی درمان مورد بررسی دقیق قرار گرفت و در پرونده‌ی بیمار ثبت گردید. دوره‌ی درمانی اول در تزریقات عضلانی ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از گلوکانتیم به مدت ۲۱ روز و سپس یک دوره‌ی استراحت ۱۴-۱۰ روزه و در تزریقات داخل ضایعه‌ای

۰/۵ میلی‌گرم گلوکانتیم به مدت ۷-۵ هفته و سپس ۱۴-۱۰ روز استراحت بود.

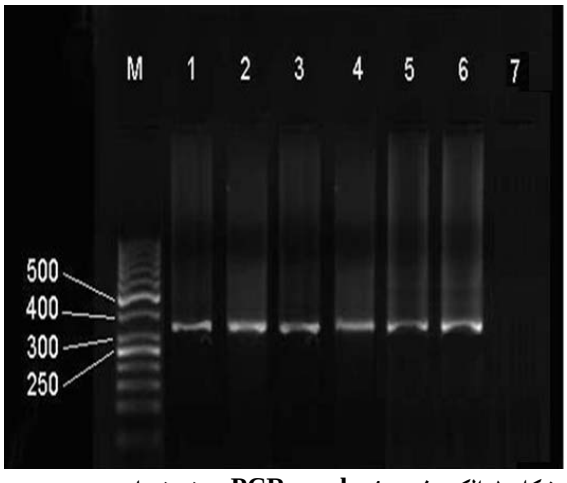
یافته‌ها

۹ نفر (۴۵ درصد) از بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی مرطوب (*L.major*) دارای یک ضایعه، ۴ نفر (۲۰ درصد) دارای ۲ ضایعه، ۴ نفر (۲۰ درصد) دارای ۳ ضایعه، ۲ نفر (۱۰ درصد) دارای ۵ ضایعه و ۱ نفر (۵ درصد) دارای ۷ ضایعه بودند.

در بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی ۳۰ درصد ضایعات در دست، ۱۰ درصد در پا، ۲۵ درصد در صورت و ۳۵ درصد در دست و سایر اندام‌ها بود.

نتایج PCR قطعه‌ی ITS-rRNA

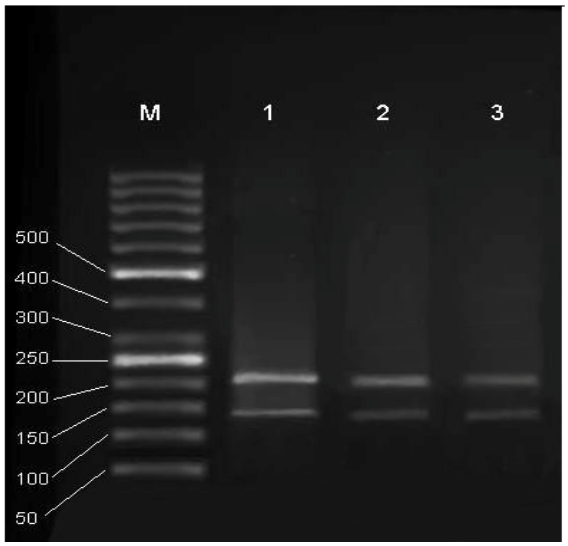
همان طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، نتایج الکتروفورز PCR- product بر روی ژل آگاروز ۱ درصد، باند ۳۵۰ جفت بازی را برای نمونه‌های لیشمانیای جدا شده از بیماران مورد مطالعه نشان داد که به طور کامل مطابق با باند به دست‌آمده از نمونه‌ی استاندارد *L.major* (MRHO/IR/75/ER) (باند ۳۵۰ جفت بازی، ستون ۱) بود.



شکل ۱. الکتروفورز PCR product در نمونه‌های مورد بررسی و استاندارد در ژل آگاروز ۱ درصد
M شناساگر مولکولی، ۱ استاندارد *L.major*، ۲ تا ۶ *L.major* PCR product، ۷ کنترل منفی

نتایج آنالیز تجزیه‌ی ITS-rRNA به وسیله‌ی آنزیم HaeIII

نمونه‌ی استاندارد *L.major* که در مرحله‌ی اول PCR باند ۳۵۰ جفت باز حاصل شده بود، بعد از هضم با آنزیم HaeIII دو باند ۲۲۰ و ۱۴۰ جفت باز را بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد نشان داد. باندهای به دست آمده از لیشمانیاهای بیماران مورد مطالعه به طور کامل مشابه با نمونه‌ی استاندارد بود (شکل ۲).



شکل ۲. الکتروفورز PCR product نمونه‌های مورد مطالعه و استاندارد بعد از هضم با آنزیم HaeIII
M شناساگر مولکولی، ۱ استاندارد *L.major*، ۲ و ۳ نمونه‌های مورد مطالعه (*L.major*)

نتایج درمان بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی مرطوب (L.major)

شکل ۳ (الف و ب) نمایانگر ضایعات بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی مرطوب قبل و بعد از درمان می‌باشند. نتایج روند التیام کامل در بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی مرطوب در جدول ۱ نشان داده شده است.

شکل ۳- الف. قبل از درمان با گلوکانتیم

شکل ۳- ب. بعد از درمان با گلوکانتیم

جدول۱. توزیع فراوانی زمان التیام بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی مرطوب تحت درمان با گلوکانتیم تزریقی بر حسب روز

زمان بهبودی کامل در بیماران *L.major* (بر حسب روز)	تعداد	درصد
۴۰	۵	۲۵
۴۷	۱	۵
۵۰	۶	۳۰
۶۰	۱	۵
۶۵	۱	۵
۷۰	۲	۱۰
۸۰	۱	۵
۹۰	۲	۱۰
۱۰۰	۱	۵
جمع کل	۲۰	۱۰۰

در بیمارانی که با تزریق گلوکانتیم مورد درمان قرار گرفته بودند، کوتاه‌ترین زمان التیام ۴۰ روز بود که در ۵ بیمار (۲۵ درصد) مشاهده گردید. طولانی‌ترین زمان بهبودی نیز ۱۰۰ روز بود که در ۱ بیمار (۵ درصد) مشاهده گردید.

دوره‌ی درمانی اول در تزریق داخل ضایعه‌ای گلوکانتیم شامل ۷-۵ هفته تزریق گلوکانتیم و سپس یک دوره‌ی استراحت ۱۴-۱۰ روز و در تزریق داخل عضلانی گلوکانتیم شامل تزریق ۲۱ روز گلوکانتیم و سپس یک دوره‌ی استراحت ۱۴-۱۰ روزه بود. در ضایعات ناشی از آلودگی با گونه‌ی *L.major* در تزریقات داخل ضایعه از مجموع ۹ بیمار ۷ نفر (۷۷/۷ درصد) در دوره‌ی درمانی اول و ۲ نفر (۳۳/۳ درصد) در دوره‌ی درمانی دوم بهبود کامل یافتند. در گونه‌ی *L.major* در تزریقات داخل عضلانی از ۱۱ بیمار ۲ بیمار (۱۸/۲ درصد) در دوره‌ی درمانی اول، ۶ بیمار (۵۴/۵ درصد) در دوره‌ی درمانی دوم و ۳ بیمار (۲۷/۳ درصد) در دوره‌ی درمانی سوم بهبود یافتند. در بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی مرطوب (*L.major*) میانگین دوره‌ی بهبود در تزریق داخل ضایعه‌ای ۴۶ روز و در تزریق داخل عضلانی ۶۸ روز به دست آمد. به طور کلی میانگین دوره‌ی بهبود کامل در افراد مورد مطالعه ۵۸ روز بود.

بحث

نتایج نشان داد که میانگین دوره‌ی بهبود کامل در مبتلایان به لیشمانیوز ۵۸ روز بود. PCR product بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی مرطوب به طور کامل مشابه با استاندارد بود، یعنی باند ۳۵۰ را نشان داد. به علاوه، نتایج نشان داد که ضایعات مورد مطالعه در منطقه‌ی اصفهان *L.major* بود.

به دلیل تفاوت گونه‌های Leishmania در میزان پاسخ به رژیم‌های درمانی مختلف و همین طور به کار بردن روش درمانی مؤثر، تعیین گونه‌ی آن ضروری است (۱۴).

با توجه به تشابهات مورفولوژیکی زیاد برای تعیین عامل بیماری در نمونه‌های حاصل از کشت بیماران در سال‌های اخیر از روش‌های مولکولی از جمله PCR استفاده گردیده است. نشان داده شده است که این روش ویژگی بالاتری نسبت به روش‌های سنتی (پارازیتولوژی و کشت) دارد (۱۱).

تکنیک PCR–RFLP شامل تکثیر هدف و هضم محصول با آنزیم‌های اندونوکلئاز (آنزیم محدود کننده) و مقایسه‌ی باندهای به دست‌آمده با شاهد می‌باشد که به طور گسترده برای تشخیص مولکولی میکروارگانیسم‌ها کاربرد دارد.

گلوکانتیم از ترکیبات ۵ ظرفیتی آنتی‌موان و از متداول ترین داروهایی است که جهت درمان CL در ایران و سایر نقاط دنیا استفاده می‌شود. مکانیسم آنتی موان‌ها مهار فعالیت گلیکولیتیک انگل‌ها و اکسیداسیون اسید چرب می‌باشد که منجر به کاهش ATP می‌گردد و به این ترتیب انرژی مورد نیاز برای بقای انگل کم می‌شود (۱۵). بهترین اثر درمانی دارو زمانی است که سیستم ایمنی میزبان سالم و بدون نقص باشد. عوارض جانبی شناخته‌شده‌ی بیشتر این داروها تهوع و اسفراغ، بثورات جلدی، عوارض قلبی، کبدی و کلیوی می‌باشد (۱۶).

در مطالعه‌ای که توسط Bensoussan و همکاران برای تعیین گونه‌ی Leishmania با استفاده از PCR-RFLP با دو پرایمر L5.8S و LITSR انجام شد، مشخص گردید که PCR-RFLP قادر به تشخیص ۷۴ درصد از نمونه‌های مثبت بود (۱۷).

در تحقیقی که در هند با استفاده از PCR-RFLP بر روی DNA به دست‌آمده از کشت انجام شد، تکثیر از منطقه‌ی ریبوزومال ITS_1 فراگمنت ۳۵۰-۳۰۰ جفت بازی را نشان داده شد، که بعد از هضم آنزیم Hae III، *L.major* دو باند ۲۱۰ و ۱۶۰ جفت بازی را بر روی ژل آگاروز تشکیل داد. نتایج ایزوله‌های در این مطالعه مشابه با نتایج بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی مرطوب در هند بود (۱۸).

در بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی مرطوب (*L.major*) میانگین دوره‌ی بهبود در تزریق داخل ضایعه‌ای ۴۶ روز و در تزریق داخل عضلانی ۶۸ روز به دست آمد.

در مطالعه‌ی مشابهی در برزیل نشان داده شد که در افراد مبتلا به لیشمانیوز جلدی- مخاطی ناشی از *L.braziliensis* در ۶۲ درصد افراد تحت درمان با گلوکانتیم و ۵۵ درصد افراد تحت درمان با پنتوستام بعد از گذشت ۳ ماه التیام حاصل شد (۱۹). دوز دارو در هر دو روش درمانی، ۲۰ میلی‌گرم به مدت ۲۱ روز بود. در بررسی حاضر نیز پس از گذشت ۳ ماه همه‌ی بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی مرطوب بهبود کامل یافتند. بنابراین از این نتایج به نظر می‌رسد که گونه‌های عامل بیماری در تعیین طول دوره‌ی درمان و بهبود کامل نقش چشمگیری دارند.

در مطالعه‌ی Tallab و همکاران اثر سه روش درمانی تزریق داخل ضایعه‌ای گلوکانتیم به صورت روزانه، یک روز در میان و هفتگی بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که تزریق داخل ضایعه‌ای گلوکانتیم به طور یک روز در میان یا هفتگی مؤثرتر از درمان روزانه بود (۲۰).

در مطالعه‌ی حاضر نیز تزریقات داخل ضایعه‌ای به صورت هفتگی انجام شد و در تزریقات داخل ضایعه‌ای در دوره‌ی درمانی اول ۷۷/۷ درصد و در دوره‌ی درمانی دوم ۲۲/۲ درصد بیماران بهبود پیدا کردند.

چندین عامل بر روی اثر داروهای آنتی‌موان و آزول‌ها در درمان لیشمانیوز مطرح است که از آن جمله می‌توان به حساسیت و اختلاف ذاتی گونه‌های Leishmania اشاره کرد. عواملی مانند کاهش توانایی سیستم ایمنی انسان علیه انگل و پایین بودن دوز مورد استفاده دارو می‌تواند به شکست درمان منجر گردد (۲۲-۲۱).

از بررسی نتایج فوق چنین به نظر می‌رسد که طول دوره‌ی درمانی برای التیام کامل در گونه‌های مختلف لیشمانیا متفاوت است.

تشکر و قدردانی

نگارندگان بر خود لازم می‌دانند از زحمات کارکنان گروه انگل‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و مرکز تحقیقات بیماری‌های پوستی و لیشمانیوز صدیقه‌ی طاهره (س) اصفهان به دلیل همکاری ارزنده‌ی آن‌ها، تشکر و قدردانی نمایند.

References

1. Schlein Y, Warburg A, Schnur LF, Gunders AE. Leishmaniasis in the Jordan Valley II. Sandflies and transmission in the central endemic area. Trans R Soc Trop Med Hyg 1982; 76(5): 582-6.
2. Minodier P, Parola P. Cutaneous leishmaniasis treatment. Travel Med Infect Dis 2007; 5(3): 150-8.
3. Oumeish OY. Cutaneous leishmaniasis: a historical perspective. Clin Dermatol 1999; 17(3): 249-54.
4. Desjeux P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. Clin Dermatol 1996; 14(5): 417-23.
5. Tashakori M, Ajdary S, Kariminia A, Mahboudi F, Alimohammadian MH. Characterization of Leishmania species and L. major strains in different endemic areas of cutaneous leishmaniasis in Iran. Iran Biomed J 2012; 7(2): 43-50.
6. Tashakori M, Kuhls K, Al-Jawabreh A, Mauricio IL, Schonian G, Farajnia S, et al. Leishmania major: genetic heterogeneity of Iranian isolates by single-strand conformation polymorphism and sequence analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer. Acta Trop 2006; 98(1): 52-8.
7. el Tai NO, Osman OF, el Fari M, Presber W, Schonian G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of Leishmania donovani spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. Trans R Soc Trop Med Hyg 2000; 94(5): 575-9.
8. Yang ZH, Huang JX, Yao YJ. Autoscreening of restriction endonucleases for PCR-restriction fragment length polymorphism identification of fungal species, with Pleurotus spp. as an example. Appl Environ Microbiol 2007; 73(24): 7947-58.
9. Rotureau B, Ravel C, Couppie P, Pratlong F, Nacher M, Dedet JP, et al. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis to identify the main new world Leishmania species and analyze their taxonomic properties and polymorphism by application of the assay to clinical samples. J Clin Microbiol 2006; 44(2): 459-67.
10. Marfurt J, Nasereddin A, Niederwieser I, Jaffe CL, Beck HP, Felger I. Identification and differentiation of Leishmania species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol 2003; 41(7): 3147-53.
11. Hagardson K. Comparison of DNA isolation methods to detect Leishmania parasites in blood samples. [Thesis]. Uppsala, Sweden: Uppsala University; 2006.
12. Reithinger R, Mohsen M, Wahid M, Bismullah M, Quinnell RJ, Davies CR, et al. Efficacy of thermotherapy to treat cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania tropica in Kabul, Afghanistan: a randomized, controlled trial. Clin Infect Dis 2005; 40(8): 1148-55.
13. Schonian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, et al. PCR diagnosis and characterization of Leishmania in local and imported clinical samples. Diagn Microbiol Infect Dis 2003; 47(1): 349-58.

14. Berman JD. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. Clin Infect Dis 1997; 24(4): 684-703.
15. Beheshti M, Ghotbi Sh, Amirizade S. Therapeutic and adverse effects of glucantime used for treatment of cutaneous leishmaniasis. Shiraz E Med J 2007; 8(4. [Online]. Available from: URL: http://semj.sums.ac.ir/vol8/oct2007/leishmaniasis.htm).
16. Drugs Information Online. Meglumine Antimoniate (Systemic). [online]. 2012. Available from: URL: http://www.drugs.com/mmx/meglumine-antimoniate.html.
17. 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): 1435-9.
18. 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.
19. Saldanha AC, Romero GA, Merchan-Hamann E, Magalhaes AV, Macedo VO. A comparative study between sodium stibogluconate BP 88R and meglumine antimoniate in the treatment of cutaneous leishmaniasis. I. The efficacy and safety. Rev Soc Bras Med Trop 1999; 32(4): 383-7. [In Portuguese].
20. Tallab TM, Bahamdam KA, Mirdad S, Johargi H, Mourad MM, Ibrahim K, et al. Cutaneous leishmaniasis: schedules for intralesional treatment with sodium stibogluconate. Int J Dermatol 1996; 35(8): 594-7.
21. Ponte-Sucre A. Physiological consequences of drug resistance in Leishmania and their relevance for chemotherapy. Kinetoplastid Biol Dis 2003; 2(1): 14.
22. Hadighi R, Mohebali M, Boucher P, Hajjaran H, Khamesipour A, Ouellette M. Unresponsiveness to Glucantime treatment in Iranian cutaneous leishmaniasis due to drug-resistant Leishmania tropica parasites. PLoS Med 2006; 3(5): e162.

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol. 30, No. 209, 3rd week, December 2012 Received: 5.9.2012 Accepted: 4.11.2012

Identification of Leishmania Species and Treatment Courses in Patients with Leishmaniasis in Isfahan, Iran

Seyed Hossein Hejazi PhD[1], Nooshin Hashemi MSc[2], Mitra Hashemi MSc[3], Narges Abdian MSc[4], Leyla Shafiei MSc[5], Siroos Hashemi DDS[6], Mohammad Ali Nilforoushzadeh MD[7]

Abstract

Background: Leishmaniasis is a parasitic infectious disease with a wide spectrum in tropical and subtropical areas. Antimoniates are compounds of choice to treat cutaneous leishmaniasis in Iran and many other countries of the world. There are many fluctuations in response to leishmanicidal agents according to type of the disease, involved species of the parasite, and drug regimen.

Methods: This study was conducted in the Skin Disease and Leishmaniasis Research Center, Isfahan, Iran. Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) and Roswell Park Memorial Institute **(**RPMI) 1640 media were used to isolate parasites from skin lesions of patients. Deoxyribonucleic acid (DNA) extraction of *Leishmania* isolates was performed and strain identification was determined using specific internal transcribed spacers-1 (ITS-1) primers. After amplification, the resulted products were analyzed using polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Patients were under traditional glucantime therapy and were followed up for 14 weeks to detect their treatment courses.

Findings: PCR-RELP showed that all etiologic agents of cutaneous leishmaniasis (CL) among referral patients in Isfahan were *L. major*. The mean duration of ulcer recovery of cases with CL was 58 days.

Conclusion: The mean recovery period of patients with zoonotic CL was noticeably shorter than cases with anthroponotic CL.

Keywords: Identification, Polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism, Cutaneous leishmaniasis, Recovery period

* This paper is derived from a thesis in Isfahan University of Medical Sciences.

[1] Associate Professor, Skin Diseases and Leishmaniasis Research Center AND Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[2] PhD Student, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Northern Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran
[3] Department of Statistics, Deputy of Research, Northern Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran
[4] PhD Student, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[5] Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[6] Dentist, Northern Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran
[7] Associate Professor, Skin and Stem Cell Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Corresponding Author: Nooshin Hashemi MSc, Email: nooshin_hashemi61@yahoo.com