

بررسی گونه ایزوله‌های ضایعات لیشمانیوز پوستی در بیماران با عدم پاسخ به درمان با

گلوکانتیم در شهر بم

ریحانه پور^۱، ایرج شریفی^{۲*}، بهرام کاظمی^۳، مهدی زارعان^۴

خلاصه

مقدمه: لیشمانیوز پوستی بیماری انگلی شایع در جهان از جمله ایران است. لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا ماژور عوامل لیشمانیوز پوستی در ایران می‌باشند و شهر بم یکی از کانون‌های بسیار قدیمی و شناخته شده آن محسوب می‌شود. هدف از این مطالعه، تعیین گونه ایزوله‌های مقاوم به گلوکانتیم (مگلو مین آنتی مونات) است تا راه کاری مناسب برای برنامه‌ریزی و کنترل بیماری در بم، فراهم شود.

روش: این مطالعه طی سال‌های ۱۳۸۷-۱۳۸۸ در شهر بم و دانشکده پزشکی کرمان صورت گرفت. از مجموع ۲۱۲۶ بیمار مبتلا به لیشمانیوز پوستی مراجعه کننده به مرکز سالک بم، ۲۳۵ نفر (۱۱/۱٪) با عدم پاسخ به گلوکانتیم بودند که ۵۱ نفر از آنان، به‌طور تصادفی انتخاب و پس از نمونه‌گیری و انجام مراحل کشت و استخراج DNA، باروش Nested-PCR، تعیین گونه شدند.

یافته‌ها: در این بررسی، ۱۲۲ نفر (۵۱/۹٪) از بیماران با عدم پاسخ به درمان با گلوکانتیم مذکور و ۱۱۳ نفر (۴۸/۱٪) مونث بودند. هیچ‌گونه اختلاف آماری معنی‌داری بین دو جنس مشاهده نگردید. حداکثر موارد عدم پاسخ به درمان در گروه‌های سنی ۱۱-۲۱ سال (۲۹/۴٪)، سپس ≤ 10 سال (۲۱/۶٪) و کمترین فراوانی (۵/۹٪) در گروه سنی بالای ۵۵ سال دیده شد. بیشتر ضایعات بر روی صورت (۵۵/۵٪) بود، ۶۴/۵٪ از بیماران دارای یک زخم بودند و ۳۳/۳٪ از آنها دارو را به‌صورت موضعی دریافت داشتند. واکنش PCR، گونه انگل عامل بیماری را در تمامی ۵۱ ایزوله مورد بررسی، لیشمانیا تروپیکا مشخص نمود.

نتیجه‌گیری: این مطالعه برای اولین بار در شهر بم بر روی نمونه‌های عدم پاسخ به گلوکانتیم، صورت گرفته است. از آنجاکه تعداد موارد بیماری و میزان بروز مقاومت در سال‌های اخیر به‌ویژه بعد از زلزله ۱۳۸۲ افزایش یافته است، مطالعات بیشتری جهت شناسایی تنوع ژنتیکی ایزوله‌های مقاوم به منظور استفاده از داروهای جدیدتر ضروری به نظر می‌رسد.

واژه‌های کلیدی: لیشمانیوز پوستی، لیشمانیا تروپیکا، مقاومت دارویی، Nested PCR، بم

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد انگل‌شناسی، مرکز تحقیقات پوست و لیشمانیوز، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۲- استاد مرکز تحقیقات پوست و لیشمانیوز و گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۳- استاد مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی و گروه انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ۴- مربی، مرکز تحقیقات پوست و لیشمانیوز، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان * نویسنده مسؤل، آدرس: کرمان، انتهای بلوار ۲۲ بهمن، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، آدرس پست الکترونیک: iraj.sharifi@yahoo.com

دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۲/۲۱ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۹/۵/۲۲ پذیرش مقاله: ۱۳۸۹/۷/۶

مقدمه

لیشمانیوز از نظر سازمان جهانی بهداشت (WHO) یکی از بیماری‌های مهم انگلی در جهان به‌شمار می‌رود. بروز سالانه جهانی آن ۲-۱/۵ میلیون نفر و شیوع آن ۱۲ میلیون نفر گزارش گردیده که حدود ۵۰۰ هزار مورد آن مربوط به لیشمانیوز احشایی و بقیه موارد مربوط به لیشمانیوز پوستی و پوستی مخاطی می‌باشد. بیش از ۹۰٪ موارد لیشمانیوز پوستی در کشورهای افغانستان، الجزیره، برزیل، ایران، پرو، عربستان، سوریه و عراق روی داده است (۱،۲).

در ایران این بیماری همواره رو به افزایش بوده به‌طوری که در ۱۵ استان کشور به‌صورت اندمیک به دو فرم اپیدمیولوژیکی مشاهده می‌شود: ۱- نوع شهری (خشک) که مخزن آن انسان و ناقل آن فلپوتوموس سرژنتی است و در شهرهای تهران، مشهد، نیشابور، بجنورد، یزد، ساوه، قم، کرمان و بم گزارش شده است. ۲- نوع روستایی (مرطوب) که مخزن آن موش صحرائی از خانواده ژربیلیده و ناقل آن فلپوتوموس پاپاتاسی است و در شهرهای اصفهان، سرخس، کاشان، اسفراین، دره گز، بافت، اهواز و اخیراً کانون جدیدی در حومه شیراز مشاهده شده است (۳-۶).

در استان کرمان شهرستان‌های بم، جیرفت، رفسنجان، شهرابک، بافت و سیرجان از کانون‌های لیشمانیوز پوستی هستند. براساس گزارش مرکز مدیریت بیماری‌ها، تعداد مبتلایان به انواع مختلف لیشمانیوز در ایران سالانه ۲۰ هزار مورد است که البته میزان قطعی آن چندین برابر این مقدار تخمین زده می‌شود. لیشمانیوز پوستی در شهر بم، به‌طور غالب از نوع شهری است که در مناطق آلوده بم، الگوی یکنواختی ندارد زیرا گونه‌ها، و وفور جمعیت پشه خاکی‌ها در نقاط مختلف شهر متفاوت می‌باشد و بیماری در طول سال وجود دارد (۶-۹).

درمان اصلی بیماری، مصرف ترکیبات آنتی‌موان ۵ ظرفیتی می‌باشد که در حال حاضر از مگلو مین آنتی‌مونات (گلوکانتیم) به‌صورت موضعی یا سیستمیک و اخیراً

به‌صورت ترکیبی اغلب همراه با کرایوتراپی، استفاده می‌شود و گزارش‌های متعددی از بروز مقاومت نسبت به آن دیده شده و باوجود تأثیر نه‌چندان خوب، همچنان به‌عنوان داروی خط اول درمان بر علیه بیماری مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۴-۲،۴،۱۰).

گرچه مکانیسم‌های مختلفی توضیح داده شده است، مقاومت دارویی در لیشمانیا مانند سلول‌های تومورال عمدتاً با کاهش تجمع دارو در سلول مرتبط است و افزایش بیان پروتئینی به‌نام P-Glycoprotein P در سلول‌های مقاوم به‌وجود آمده که وابسته به خانواده ناقلین ATP-binding cassette است که در efflux دارو نقش دارند. انتقال‌دهنده‌های ABC، پروتئین‌های غشایی بوده که طیف وسیعی از داروهای شیمیایی را با انتقال وابسته به ATP از هدف دارو که سلول می‌باشد، دور می‌کند (۱۸-۱۵).

تشخیص لیشمانیوز پوستی با تهیه گسترش مستقیم از ضایعه و کشت آن صورت می‌گیرد که با توجه به پایین بودن حساسیت آن، تنها می‌تواند جنس انگل را مشخص نماید و قادر به تعیین گونه لیشمانیا نیست. برخلاف انگل‌های مالاریا که گونه‌های مختلف آن دارای اشکال متفاوت مورفولوژیکی بوده، تمام عوامل لیشمانیوز در زیر میکروسکوپ به یکدیگر شباهت دارند و تعیین گونه انگل بر اساس علائم بالینی و اپیدمیولوژیکی، به دلیل آنکه ممکن است با یکدیگر و بیماری‌های پوستی دیگر اشتباه شود، روش مناسبی محسوب نمی‌شود. اگرچه روش ایزوآنزیم به عنوان استاندارد طلایی (Gold standard) برای تعیین گونه انگل استفاده می‌شود، ولی به دلیل هزینه فراوان، وقت‌گیر بودن، نیاز به سیستم‌های آنزیمی مختلف و دشواری کار، تنها در موارد معدودی از مراکز تحقیقاتی جهت تشخیص گونه و سویه استفاده می‌شود. از طرفی با توجه به پیشرفت‌های روز افزون، استفاده از روش‌های مولکولی در تشخیص لیشمانیوز پوستی در حد گونه و زیرگونه اهمیت دارد، زیرا می‌توان به کمک آن شناسنامه

روش بررسی

مطالعه حاضر از نوع توصیفی و مقطعی بوده که در شهر بم از اواخر دی ماه ۱۳۸۷ تا اوایل مهر ماه ۱۳۸۸ در مرکز پیشگیری و درمان سالک، انجام گردید. از نظر بالینی بیماران مقاوم به درمان با گلوکانتیم (nonhealing) طبق پروتکل کشوری وزارت بهداشت و درمان، بیمارانی می‌باشند که دچار عود بیماری (Relapse) و شکست درمان بوده و حداقل دو دوره کامل ۲۱ روزه درمانی به شکل سیستمیک (عضلانی)، یا ۴ مرتبه در ۴ هفته به شکل موضعی دارو را دریافت داشته و بهبودی حاصل نکرده‌اند. اکثر ضایعات مقاوم در حاشیه خود حاوی ندول اریتماتوز و پلاک‌هایی با پوسته‌های کم بوده و در موارد عود (لیشمانیوز رسیدیوانس) در همان محل قبلی، مجدداً پاپول‌های جدید پدید می‌آید (۹).

به علت سخت رشد بودن یا عدم رشد برخی از این نمونه‌ها در محیط کشت و آلودگی زخم‌ها به عوامل ثانویه، تنها موفق به کشت ۵۱ نمونه شدیم و برای هر فرد، پرسش‌نامه‌ای حاوی داده‌های دموگرافیک از جمله نام و نام خانوادگی، جنس، سن و محل سکونت و مشخصات بالینی ضایعه از قبیل محل، تعداد زخم، نوع درمان، مدت زمان مصرف دارو و طول دوره درمان به دقت تکمیل گردید.

نمونه‌ها از ضایعات پوستی پس از ضدعفونی کردن با الکل اتیلیک ۷۰٪ به منظور جلوگیری از عفونت‌های ثانویه باکتریال و قارچی، به کمک اسکالپل و تیغ جراحی شماره ۱۵، از حاشیه متورم و ملتهب زخم گرفته شده و گسترشی بر روی لام تهیه و همزمان نمونه دیگری به محیط کشت دوفازی (NNN) در کنار شعله تلقیح گردید. گسترش‌های مستقیم به وسیله الکل متیلیک فیکس و با گیمسا رنگ آمیزی و ابتدا با درشت نمایی ۴۰x، سپس ۱۰۰x با استفاده از میکروسکوپ نوری جهت مشاهده آماستیگوت‌ها، مورد بررسی قرار گرفت.

عوامل ایجادکننده بیماری را در منطقه تعیین و بستر مناسبی جهت انجام مطالعات درمانی، اپیدمیولوژیکی و کنترل آن فراهم نمود (۹،۱۹).

هدف از این مطالعه، تعیین گونه ایزوله‌های مقاوم به گلوکانتیم در شهر بم، با استفاده از روش Nested-PCR که دارای حساسیت و ویژگی بالایی است، می‌باشد. باتوجه به اینکه تاکنون هیچ مطالعه‌ای بر روی موارد مقاوم به لیشمانیوز پوستی در بم صورت نگرفته است، ضرورت انجام این بررسی به منظور برنامه‌ریزی و درمان مناسب موارد، به شدت احساس می‌شود. شهر بم در ۱۸۵ کیلومتری جنوب شرقی کرمان قرار دارد که از شرق به زاهدان و ایرانشهر و از جنوب به کهنوج و از غرب به جیرفت محدود می‌شود. این شهر در ارتفاع ۱۰۶۰ متری از سطح دریا واقع بوده و دارای آب و هوای گرم و خشک و متغییری است به طوری که در تابستان دمای آن به ۴۶°C و در زمستان به ۲°C می‌رسد و میزان بارندگی سالیانه آن ۶۸ میلی‌متر و رطوبت نسبی هوا به ۲۵٪ می‌رسد. گرچه محصولات زیادی در بم کشت می‌شود ولی خرما و مرکبات عمده محصولات کشاورزی آن را تشکیل می‌دهند. بعد از زلزله دی ماه سال ۱۳۸۲، مرکزی تحت عنوان پیشگیری و درمان بیماری سالک در شهر بم، به منظور درمان بیماران تاسیس گردیده است که تمامی بیماران مبتلا به لیشمانیوز پوستی در شهرستان برای تشخیص و درمان به این مرکز مراجعه می‌نمایند. در حال حاضر، یکی از چالش‌های عمده در بم بروز موارد لیشمانیوز پوستی مقاوم نسبت به گلوکانتیم بوده و اقدامات کنونی برای درمان بیماران، کنترل بیماری را به‌ویژه بعد از زلزله با دشواری‌های فراوان روبه‌رو نموده است. بررسی مقاومت دارویی از نظر بالینی و به دنبال آن مطالعه مقاومت ژنتیکی ایزوله‌ها می‌تواند گامی اساسی برای درمان مناسب این گونه بیماران فراهم نموده و زمینه لازم به منظور دستیابی به راه‌های کنترل را تسهیل نماید.

استفاده شد. این پرایمرها قادرند قطعه متغییر مینی سرکل‌های تمام انواع لیسمانیاه را تکثیر نمایند و طول قطعاتی معادل ۷۵۰bp برای لیسمانیا تروپیکا، ۵۶۰bp برای لیسمانیا ماژور و ۶۸۰bp برای لیسمانیا اینفانتوم ایجاد نمایند. واکنش Nested-PCR، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مرحله اول آن به همراه $MgCl_2(25Mm)$, $Taq(5u/\mu)$, $PCRbuffer(10x)$, $dNTP(10Mm)$ شرکت Roche آلمان در دستگاه ترموسایکلر طبق پروتکل دمایی در شرایط بهینه، به همراه سویه‌های استاندارد لیسمانیا ماژور (MRHO/IR /64/Nadim-1strain) و لیسمانیا تروپیکا (MHOM/Sudan/58/OD strain) و مارکر (Ladder) انجام گردید.

الکتروفورز و اسکن محصول PCR

مقدار ۵ μ l از هر محصول PCR در کنار مارکر ۱۰۰bp، در ژل آگارز ۱/۵٪ به همراه اتیدیوم بروماید به مدت ۴۵ دقیقه در ولتاژ ۱۰۲ میلی آمپر الکتروفورز و الگوی باندهای حاصل با دستگاه ژل داکيومنتیشن مشاهده و ثبت گردید. داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS 17 و آزمون کای دو (χ^2) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و سطح اطمینان $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

در این بررسی، از ۲۱۲۶ نفر مبتلا به سالک مراجعه کننده به مرکز پیشگیری و درمان سالک بم طی دی‌ماه ۸۷ الی مهر ماه ۸۸، ۱۰۲۸ نفر مذکر و ۱۰۹۸ نفر مؤنث بودند و از این میان، ۲۳۵ نفر (۱۱/۱٪) که مقاوم به داروی گلوکانتیم بودند، انتخاب شدند. از این افراد ۱۲۲ نفر (۵۱/۹٪) مذکر بودند که ۷۱ نفر شکست درمان داشته و ۵۱ نفر دچار عود بیماری شدند. از ۱۱۳ نفر (۴۸/۱٪) مؤنث ۴۸ نفر شکست درمان و ۶۵ نفر عود بیماری داشتند. از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین دو جنس مشاهده نگردید. حداکثر موارد عدم

محیط‌های کشت تحت شرایط سرما در جعبه یخ، به آزمایشگاه کشت گروه انگل‌شناسی دانشکده پزشکی منتقل و درانکوباتور دردمای $24 \pm 2^\circ C$ نگهداری و در فواصل ۲-۳ روز یک‌بار به مدت چهار هفته از نظر رشد پروماستیگوت‌ها، مورد بررسی قرار گرفت. پروماستیگوت‌ها بعد از رشد، به محیط کشت مایع RPMI 1640 حاوی ۲۰٪ سرم جنین گاوی (FCS) که قبلاً در دمای $56^\circ C$ به مدت ۳۰ دقیقه غیرفعال شده بود، در مجاورت $200iu/ml$ پنی‌سیلین و $200\mu g/ml$ استرپتومایسین، جهت تکثیر انبوه، انتقال داده شد (۲۰).

استخراج DNA و انجام مراحل PCR

برای استخراج DNA، مقداری از محیط RPMI 1640 حاوی پروماستیگوت‌های فاز ثابت انگل به داخل میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته و پس از سانتریفوژ و شستشو با بافر فسفات (PBS)، ۲۰۰ μ l از آن با کیت Bioneer که به روش پروتیناز K، استخراج گردید.

به علت عدم رشد مناسب پروماستیگوت‌ها در محیط RPMI 1640 در برخی از نمونه‌ها، برای استخراج DNA از گسترش مستقیم استفاده و غلظت DNA با استفاده از دستگاه Nanodrop در طول موج ۲۶۰nm تعیین گردید.

در این مطالعه، روش مولکولی Nested-PCR براساس روش Noyes و همکاران انجام شد که حساسیت و ویژگی آن به ترتیب ۹۲٪ و ۱۰۰٪ می‌باشد (۲۱).

با استفاده از پرایمرهای اختصاصی بخش متغییر (variable) مینی سرکل DNA کینتوپلاست لیسمانیا را تکثیر کرده که در مرحله اول PCR، از پرایمرهای:

CSB1XR (ATTTTTCGCGATTTTCGAGAACG)

CSB2XF (CGAGTAGCAGAACTCCC GTTCA)

و در مرحله دوم PCR، از پرایمرهای:

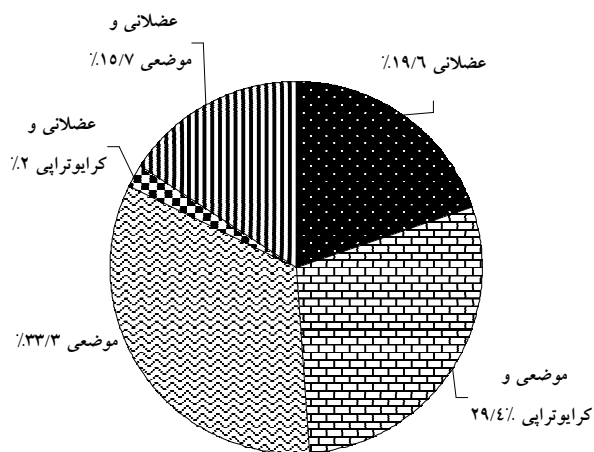
LiR (TCGAGAACGCCCT)

13Z (ACTGGGGGTTGGTGTAAAATAG)

پاسخ به درمان در گروه سنی ۲۱-۱۱ سال (۲۹/۴٪)، سپس در گروه ۱۰ ≤ سال (۲۱/۶٪)، و کمترین فراوانی در گروه سنی بالای ۵۵ سال (۵/۹٪) مشاهده گردید (جدول ۱).

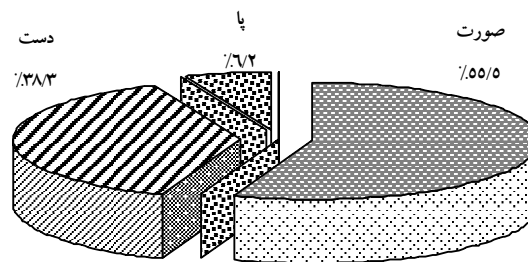
جدول ۱. توزیع فراوانی بیماران مقاوم به گلوکانتیم در بیم در سال‌های ۸۱-۸۷ به تفکیک جنس و گروه‌های سنی

گروه سنی (سال)	مؤنث تعداد(درصد)	مذکر تعداد(درصد)	جمع(درصد)
≤۱۰	۲۲ (۲۷/۳)	۳۴ (۷۲/۷)	۵۶ (۱۰۰)
۱۱-۲۱	۳۱ (۲۰)	۴۲ (۸۰)	۷۳ (۱۰۰)
۲۲-۳۲	۱۲ (۴۲/۹)	۱۶ (۵۷/۱)	۲۸ (۱۰۰)
۳۳-۴۳	۲۰ (۷۲/۴)	۱۲ (۲۷/۶)	۳۲ (۱۰۰)
۴۴-۵۴	۱۶ (۶۲/۵)	۱۰ (۳۷/۵)	۲۶ (۱۰۰)
۵۵≤	۱۲ (۶۶/۷)	۸ (۳۳/۳)	۲۰ (۱۰۰)
جمع	۱۱۳	۱۲۲	۲۳۵ (۱۰۰)



نمودار ۲. میزان فراوانی بیماران مبتلا به گلوکانتیم در بیم در سال‌های ۸۱-۸۷ بر حسب نوع درمان

اندازه ضایعات به طور متوسط ۵-۲ Cm و بیشتر بر روی صورت (۵۵/۵٪)، سپس در دست (۳۸/۳٪) و پا (۷/۲٪) دیده شد و ۶۴/۵٪ بیماران دارای یک زخم، ۳۳/۴٪ دو زخم و تنها ۲/۱٪ از آنها ۳ زخم یا بیشتر داشتند و میانگین تعداد زخم‌ها ۱/۵ عدد بود (نمودار ۱).

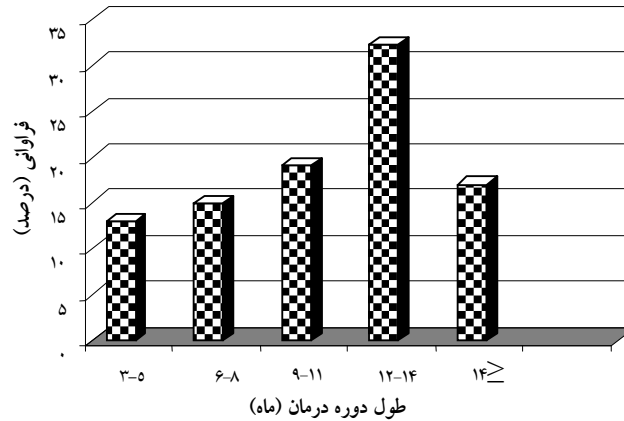


نمودار ۱. میزان فراوانی محل ضایعه در بیماران مقاوم به گلوکانتیم در بیم در سال‌های ۸۱-۸۷

از نظر مدت زمان مصرف دارو، بیشتر بیماران ۱۰۵ روز (۴۷/۶٪)، سپس ۸۴ روز (۳۱/۶٪)، ۶۳ روز (۱۵٪) و ۴۲ روز (۵/۸٪)، گلوکانتیم را مصرف کرده بودند. از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین مدت زمان مصرف دارو و نوع درمان، مشاهده نگردید. از نظر تعداد دوره‌های مصرف دارو در بیماران مقاوم، ۳۳/۳٪ از آنها ۵ دوره و ۳۱/۷٪، ۴ دوره و ۲۱/۸٪ از بیماران ۳ دوره و ۱۳/۲٪ از آنها، ۲ دوره

بیشترین نوع درمان در بیماران تحت مطالعه، شامل تزریق موضعی گلوکانتیم (۳۳/۳٪)، تزریق موضعی همراه با کرایوتراپی (۲۹/۴٪)، تزریق عضلانی (۱۹/۶٪)، عضلانی و موضعی (۱۵/۷٪) و عضلانی و کرایوتراپی (۲٪) می‌باشد (نمودار ۲).

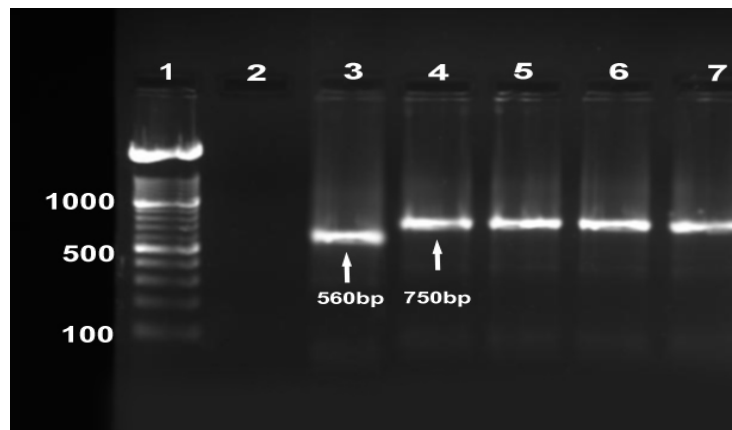
گلوکانتیم، دریافت کرده بودند. از نظر طول دوره درمان،
بیشتر از ۱۴ ماه و ۱۵/۹٪ افراد ۸-۶ ماه و تنها ۱۳/۷٪ افراد ۵-
۳ ماه سیر درمانی آنها ادامه داشته است (نمودار ۳).



نمودار ۳. میزان فراوانی بیماران مقاوم به گلوکانتیم در بیم در سالهای ۸۱-۸۷ بر حسب طول دوره درمان

نتایج واکنش Nested-PCR نشان داد که تمام ایزوله‌های
جدا شده از بیماران در این مطالعه، گونه لیشمانیا تروپیکا
می‌باشند به جز دو ایزوله که الگوی باندهای آنها بیشتر یا
کمتر از ۷۵۰bp بود (شکل ۱).

از نظر سابقه بیماری‌های مزمن همراه با سالک، ۱۳٪
افراد که بیشتر آنها زنان بودند مبتلا به آنمی بوده و ۲٪
دیابتیک و بقیه مشکلی نداشتند و از نظر آماری اختلاف
معنی‌داری بین جنس و سابقه بیماری مشاهده نگردید.
از نظر بروز مقاومت، بیشترین موارد در ماه‌های اسفند،
تیر و مهر و کمترین موارد مربوط به دی ماه، می‌باشد.



شکل ۱. تصویر نتیجه PCR ژل آگارز نمونه‌های مقاوم به گلوکانتیم در بیم در سال‌های ۸۱-۸۷

تصویر ژل بالا شامل الگوی مربوط به باندهای حاصل از انجام روش Nested-PCR بر روی ایزوله‌های مقاوم جدا شده از بیم می‌باشد. جایگاه شماره ۱، مارکر ۱۰۰۰bp، جایگاه شماره ۲، کنترل منفی و جایگاه شماره ۳، سویه استاندارد لیشمانیا ماژور در ناحیه ۵۶۰bp و جایگاه شماره ۴ مربوط به سویه استاندارد لیشمانیا تروپیکا در ناحیه ۷۵۰bp و جایگاه‌های بعدی مربوط به ایزوله‌های مقاوم جدا شده از بیم می‌باشد که قطعه‌ای در حدود ۷۵۰bp داشته و مطابقت با گونه لیشمانیا تروپیکا دارد.

بحث

کنترل لیشمانیوز پوستی در سطح جهان با معضلات فراوانی همراه بوده است و متأسفانه میزان بروز آن برخلاف اغلب بیماری‌های انگلی رو به افزایش است. با وجود تلاش‌هایی که در زمینه کنترل بیماری از دیرباز در کشورمان صورت گرفته است، در سال‌های اخیر، همواره اپیدمی‌هایی در نقاط مختلف کشور همراه با اشکال مقاوم به درمان روی داده است (۹).

عوامل زیست محیطی و بلایای طبیعی از جمله زلزله، مهاجرت‌های بی‌رویه و وجود خانه‌هایی با شرایط غیراستاندارد و هجوم پناهندگان جنگی و تغییر الگوی زندگی و ظهور رفتارهای متفاوت انگل، بر روند و سیمای اپیدمیولوژیکی بیماری تأثیر قابل ملاحظه‌ای گذاشته است. از این رو شناسایی قطعی گونه انگل در هر منطقه، برای درمان مناسب و انتخاب راهکاری مناسب به منظور کنترل بیماری، ضرورت می‌یابد. زیرا هر نوع مطالعه‌ای بر روی خصوصیات اپیدمیولوژیکی و درمانی بیماری، بدون تعیین گونه و در مواردی سویه اصلی انگل عامل بیماری، فاقد ارزش و اعتبار لازم است (۲۲).

مقاومت دارویی امروزه مشکل جدی در مبتلایان به بیماری‌های عفونی بوده و ظهور آن و اطلاعات محدود از مکانیسم‌های آن، سبب شده که بروز مقاومت به عنوان معضل عمده‌ای در درمان و کنترل لیشمانیوز پوستی به ویژه نوع شهری محسوب گردد. لیشمانیا تروپیکا منحصر به انسان (انتروپونتیک) می‌باشد و کنترل آن مبتنی بر تشخیص فوری و درمان صحیح، به موقع و موثر بیماران می‌باشد. در حالی که لیشمانیا ماژور، زئونوتیک بوده و کنترل آن، عمدتاً از طریق مبارزه با مخزن بیماری که موش‌های صحرایی از خانواده ژربیلیده است، انجام می‌گیرد (۲۳).

بیشتر از ۶ دهه از مصرف ترکیبات آنتی‌موان ۵ ظرفیتی برای درمان لیشمانیوز پوستی و احشایی در دنیا می‌گذرد و

۱۵-۱۰٪ افراد آلوده به لیشمانیوز پوستی تحت درمان با گلوکانتیم، طی ۱۰-۱۲ سال گذشته با عدم پاسخ به درمان مواجه گشته و طبق بررسی‌های انجام شده، وجود سویه مقاوم به دارو ثابت گردیده است (۱۱-۱۳).

در هند بیش از ۶۵٪ بیماران شکست درمان یا عود بعد از درمان با ترکیبات آنتی‌موان را تجربه کرده و همچنان از سال ۱۹۹۰، ایزوله‌های جدا شده از آنجا، با کاهش حساسیت به ترکیبات فوق همراه بوده ولی با وجود مقاومت، هنوز این ترکیبات به عنوان داروی مؤثر خط اول تجویز می‌گردد (۱۴).

در ایران متأسفانه افزایش موارد مقاوم لیشمانیا تروپیکا به دارو از نقاط مختلف گزارش شده است (۲۵-۲۴، ۱۳) و بروز مقاومت به گلوکانتیم در این مطالعه با موارد گزارش شده از نقاط دیگر کشور مطابقت دارد. یکی از چالش‌های اصلی برای درمان لیشمانیوز پوستی، ایجاد فرم‌های مقاوم است. از این رو، استفاده از داروهای خط دوم که هنوز مقاومت نسبت به آنها گزارش نشده است، گرچه تأثیر آنها کمتر بوده، ضرورت بیشتری می‌یابد (۲۶). شهر بم از کانون‌های قدیمی لیشمانیوز پوستی بوده و اولین بار بیماری توسط ندیم و افلاطونیان در سال ۱۳۷۱، در این شهر به ثبت رسید (۴). موارد مقاوم به گلوکانتیم در بم، بعد از زلزله مصیبت‌بار سال ۱۳۸۲ افزایش یافت و حداکثر موارد آن طی سال‌های ۸۶-۸۵ گزارش گردیده است.

البته بعد از ایجاد منطقه اقتصادی و ساخت شهرک ارگ جدید که در ۱۰ کیلومتری شهر بم واقع است و افزایش تردد افراد تازه وارد و حساس به منطقه و توسعه صنایع و کشاورزی و اسکان افراد مهاجر در شهر تماس پشه حاکی با انسان زیاد شده و تا حدودی بر چهره اپیدمیولوژی بیماری تأثیر گذاشته است (۲۷) که نتایج بررسی حاضر نیز حاکی از این وضعیت می‌باشد.

در مطالعات افلاطونیان و شریفی در سال ۱۳۸۴ (۳)، و آقاسی و شریفی در سال ۱۳۷۷ (۲۸)، نشان داده شده که

متغیر بسیار اختصاصی عمل کرده و هیچ واکنش متقاطع با DNA موجود زنده دیگری ندارد. از این رو، روش بسیار حساس و دقیقی جهت تعیین گونه لیسمانیا می‌باشد (۳۲-۳۰).

به کارگیری روش استخراج DNA از روی گسترش لام حاوی ضایعات پوستی، علاوه بر تشخیص سریع بیماری و تعیین گونه انگل، نیاز به کشت انبوه لیسمانیا را در محیط RPMI 1640 مرتفع ساخته است و این روش برای اولین بار در گروه انگل‌شناسی دانشکده پزشکی انجام پذیرفت و تأییدی بر حساسیت بالای روش Nested-PCR بود (۳۳) زیرا در گسترش‌های تهیه شده، آماستیگوت‌ها به فراوانی پروماستیگوت‌ها در محیط کشت نمی‌باشند.

نتیجه‌گیری

این بررسی برای اولین بار بر روی نمونه‌های مقاوم به گلوکانتیم در شهر بم صورت گرفته است. نتایج نشان می‌دهد که تمامی گونه‌های مقاوم، لیسمانیا تروپیکا می‌باشند و تحقیقات بیشتری برای شناسایی تغییرات ژنتیکی ژنوتایپ‌های لیسمانیا تروپیکا به منظور انتخاب درمانی مناسب، ضروری می‌باشد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از همکاری‌های کارکنان پرتلاش مرکز پیشگیری و کنترل سالک در بم، تشکر و قدردانی می‌شود. اعتبار این طرح توسط حوزه معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کرمان تأمین شده است.

فلبوتوموس سرزنتی ناقل اصلی بیماری در شهر بم است و پشه خاکی طی ۹ ماه از سال فعالیت داشته و بیماری در تمام طول سال وجود دارد.

بررسی افلاطونیان و شریفی بر روی فراوانی لیسمانیوز پوستی افراد مراجعه‌کننده به مرکز بهداشت بم، نشان داد که طی سال‌های ۸۳-۷۹ تاکنون تغییراتی در چهره اپیدمیولوژی بیماری از جمله سن و جنس ایجاد گردیده است (۳).

در این بررسی، گروه‌های سنی زیر ۲۱ سال نسبت به گروه‌های دیگر مقاومت بیشتری نشان دادند، در حالی که لیسمانیوز پوستی نوع شهری بر اساس شواهد بالینی و اپیدمیولوژی، تمام گروه‌های سنی را مبتلا می‌کند. بروز بیشتر مقاومت در این گروه سنی که درصد قابل توجهی از افراد سنین مدرسه می‌باشند، احتمالاً به دلیل هراسی است که این گروه سنی نسبت به تزریق دارو از خود نشان می‌دهند و از مراجعات بعدی خودداری نموده و احتمالاً همین امر می‌تواند در بروز مقاومت نقش مؤثری ایفا نماید. مقاومت در تمام طول سال مشاهده گردید گرچه موارد آن طی ماه‌های تیر، مهر و اسفند به اوج خود رسید.

بررسی افکار و همکاران در سال ۱۳۸۴، نشان داد که در ۹۱/۱٪ گونه انگل لیسمانیا تروپیکا و ۸/۹٪ لیسمانیا ماژور بوده است (۲۷). در بررسی انجام شده توسط شریفی و همکاران در سال ۱۳۷۴، ۱۰-۵٪ موارد لیسمانیا ماژور و بقیه لیسمانیا تروپیکا بودند (۲۹).

در تکنیک مولکولی Nested-PCR، قسمت Minicircle-KDNA دارای مناطق حفاظت‌شده و متغیر است که قسمت

Identification of Nonresponsive Isolates to Glucantime in Patients with Cutaneous Leishmaniasis in Bam

Pour R., M.Sc.¹, Sharifi I., Ph.D.^{2*}, Kazemi B., Ph.D.³, Zarean M., M.Sc.⁴

1- M.Sc. Student in Parasitology, Dermatology and Leishmaniasis Research Center, Parasitology and Mycology Dept., Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.

2- Professor of Parasitology, Dermatology and Leishmaniasis Research Center & Parasitology and Mycology Dept., Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.

3- Professor of Parasitology, Cellular and Molecular Research Center & Parasitology, School of Medicine, Shahid Baheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

4- Instructor, Dermatology and Leishmaniasis Research Center & Parasitology and Mycology Dept, Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.

* Corresponding author, e-mail: iraj.sharifi@yahoo.com

(Received: 11 May 2010 Accepted: 28 Sep. 2010)

Abstract

Background & Aims: Cutaneous leishmaniasis (CL) is a prevalent disease worldwide including Iran. In Iran *Leishmania tropica* and *Leishmania major* are two causing factors of cutaneous leishmaniasis and Bam is one of the old and well-known focuses of CL. The objective of the present study was to identify the resistant isolates to meglumine antimoniate (MA) for implementation of future control measures in Bam.

Methods: This work has been conducted during 2009-2010 in the city of Bam and Kerman School of Medicine. From a total of 2126 patients with CL, 235 patients (11.1%) were resistant against MA (Glucantime) of whom 51 ones were randomly selected. Skin scrapings were taken for direct smear preparations and culture media and Nested-polymerase chain reaction (PCR) were used for species identification.

Findings: In this study, 122 males (51.9%) and 113 females (48.1%), resistant to MA were identified that shows no significant difference between the two sexes. With a significant difference most of the resistant patients were in the age group 11-21 years (29.4%), followed by ≤ 10 years (21.6%) and the lowest were in the age group ≥ 55 years (5.9%). Most of the lesions were on face (55.5%), the majority had one lesion (64.5%) and 33.3% received MA intra-lesionally. According to the results of PCR, all 51 isolates were *Leishmania tropica*.

Conclusion: To our knowledge this is the first study that is carried out on the resistant patients to MA in Bam. Since the incidence of this disease and drug resistance have been increased after the earth quake of 2003, further studies to identify genetic variants of resistant isolates in order to use new alternative drugs are required.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis, *Leishmania tropica*, Drug resistance, Nested PCR, Bam.

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2011; 18(2): 123-133

References

1. Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95(3): 239-43.
2. Desjeux P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004; 27(5): 305-18.

3. Aflatoonian MR, Sharifi I. Prevalence of cutaneous leishmaniasis in Bam & Barawat, Iran. *J Kerman Univ Med Sci* 2006; 14(2): 82-9 [Persian].
4. Nadim A, Aflatoonian MR. Anthroponotic cutaneous leishmaniasis in the city of Bam, southeast Iran. *Iranian J Pub Health* 1995; 24(1-2): 15-24 [Persian].
5. Sharifi I, Zemani F, Aflatoonian MR, Fekri AR. A report of cutaneous leishmaniasis epidemic and its probable causative factors in Baft district, Kerman province. *Iran J Epidemiol* 2008; 4(1): 53-58 [Persian].
6. Yaghoobi -Ershadi MR, Hanafi A, Javadian E, Jafari R, Zahraei- Ramazani AR, Mohebbali M. A new focus of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica*. *Saudi Med J* 2002; 23(3): 291-4.
7. Center for Management of Diseases, Office of Zoonotic Disease Control, Ministry of Health and Medical Education. Management of cutaneous leishmaniasis program for Bam. 2008; pp1-56 [Persian].
8. Sharifi I, Fekri A.R, Aflatoonian MR, Nadim A, Nikian Y, Khamesipour A. Cutaneous leishmaniasis in primary school children in the eastern Iranian city of Bam 1994- 95. *Bull World Health Organ* 1998; 76(3):289-293.
9. Sharifi I, Fekri AR, Aflatoonian MR, Khamesipour A, Mabhoudi F. Leishmaniasis recidivans among school children in Bam, south -east Iran, 1994-2006. *Int J Dermatol* 2010; 40:557-561.
10. Croft SL, Seifert K, Yardley V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J Med Res* 2006; 123(3): 399-410.
11. Croft SL, Sundar Sh, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19(1): 111-296.
12. Grogl M, Thomason TN, Franke ED. Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 47(1):117-26.
13. Hadighi R , Mohebbali 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): 162-8.
14. Sundar S, More DK, Singh MK, Sharma S, Makharia A, Kumar PC, et al. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India. *Clin Infect Dis* 2000; 31(4): 1104-1107.
15. Hoffmeyer S, Burk O, Von Richter O, Arnold H .P, Brockmoller J, John A, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity *In vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(7): 3473-8.
16. Leandro C, Campino L. Leishmaniasis: efflux pumps and chemoresistance. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 22(3): 352-7.
17. Leprohon P, Legar D, Girard I, Papadoopoulou B, Ouellette M. Modulation of *Leishmania* ABC protein gene expression through life stages and among drug resistant parasites. *Eukaryot Cell* 2006; 5(10): 1713-25.
18. Perez -Victoria JM, Di Pietro A, Barron D, Ravelo AB, Castanys S, Gamarro F. Multidrug resistance phenotype mediated by the p-glycoprotein-like transporter in *Leishmania*. *Curr Drug Targets* 2002; 3(4): 311-33.

19. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 2005; 366(9496):1561-77.
20. Evans DA. Leishmania. In: Taylor AER, Baker JR, (Editors). *In vitro* methods for parasite cultivation. London, Academic Press, 1987; PP 52-7.
21. Noyes H, Reyburn H, Bailey WJ, Smith DA. Nested-PCR based chizodem method for identifying *Leishmania* kinetoplast mini-circle classes directly from clinical samples and its application on the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2877-4881.
22. Maraghi S, Samarbaaf Zadeh A. Identification of cutaneous leishmaniasis agents by Nested-PCR in Shush city, Khozestan province, Iranian Iran. *Iran J Parasitol* 2007; 12(3):13-15.
23. Nadim A, Javadian E, Mohebbali M, Momeni A. *Leishmania* and Leishmaniasis 3rd ed., Tehran, University Center Pub, 2008; P 288.
24. Motazedian M. Study of glucantime resistance in cutaneous leishmaniasis by PCR-RFLP method in Shiraz, Iran. Abstract of European Congress of Clin Microb and Infect Dis, Prague, Czech Republic, 2004; 1-4:86.
25. Shahbazi F. Genetic diversity of *Leishmania tropica* MDR1 gene in isolates in 2008-2009, city of Mashhad. PhD Dissertation in Parasitology, Shahid Baheshti University of Medical Sciences [Persian].
26. Hadighi R, Boucher P, Khamesipour A, Meamar AR, Roy G, Ouellette M, Mohebbali M. Glucantime-resistant *Leishmania tropica* isolated from Iranian patients with cutaneous leishmaniasis are sensitive to alternative antileishmania drugs. *Parasitol Res* 2007; 101(5):1319-22.
27. Afkar A, Sharifi I, Aflatoonian MR, Fasihi Harandi M, Fotouhi Ardakani R, Nosratabadi SJ. Epidemiological study of cutaneous leishmaniasis in Bam and Barawat during 2005 and identification of the causative species by PCR. Presented in the 6th Congress on Parasitic Diseases in Iran, Karaj, 1999 [Persian].
28. Aghasi M, Sharifi I. Survey of the fauna and monthly activity of the sandfly as the vectors of the cutaneous leishmaniasis in the city of Bam. *Iranian J Med Sci* 2003; 10(2):85-91 [Persian].
29. Sharifi I, Ardehali S, Motazedian H, Aflatoonian MR, Fekri AR, Ahmadi Mousavi MR. Identification and characterization of *Leishmania* isolates in school children in Bam, south- eastern Iran. *Iranian J Med Sci* 1994; 22 (3, 4): 82-88.
30. Mahboudi F, Abolhassan 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.
31. Rodriguez N, De Lima H, Aguilar EM Rodeiguez A, Barker DC, Convit J. Molecular epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Venezuela. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96(suppl): 105-9.
32. 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; 4(1):394-58.
33. Gangneux JP, Menotti J, Lorenzo F, Sarfati C, Blanche H, Bui H, et al. Prospective value of PCR amplification and sequencing for diagnosis and typing of old world *Leishmania* infections in an area of nonendemicity. *J Clin Microbiol* 2003; 41(4): 1419-22.

