● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ هجدهم، شمارهٔ ۲، ص ۱۳۳-۱۲۳، ۱۳۹۰

مقالهٔ پژوهشی

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 وشناخته شده آن محسوب می‌شود. هدف از این مطالعه، تعیین گونه ایزوله‌های مقاوم به گلوکانتیم (مگلومین آنتی‌مونات) است تا راه‌کاری مناسب برای برنامه‌ریزی و کنترل بیماری در بم، فراهم شود.

روش: این مطالعه طی سال‌های ۱۳۸۸-۱۳۸۷ 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 مذکر 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 ۲۱-۱۱ سال (۲۹/۴٪)، سپس ۱۰≤ 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. واکنشPCR، گونه انگل عامل بیماری را در تمامی ۵۱ ایزوله مورد بررسی، لیشمانیا تروپیکا مشخص نمود.

نتیجه‌گیری: این مطالعه برای اولین بار در شهر بم برروی 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 افضلی‌پور،دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۲- استاد مرکز تحقیقات پوست و لیشمانیوز و گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی افضلی پور، 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 افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

* **نویسنده مسؤول، آدرس:** کرمان، انتهای بلوار ۲۲ بهمن، دانشکده پزشکی افضلی‌پور، مرکز تحقیقات پوست و لیشمانیوز ● **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 سالیانه جهانی آن ۲-۱/۵ میلیون نفر و شیوع آن ۱۲ میلیون نفرگزارش 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 به‌طوری‌که در ۱۵ استان کشور به‌صورت اندمیک به دو فرم اپیدمیولوژیکی مشاهده می‌شود: ۱- نوع شهری (خشک) که مخزن آن انسان و ناقل آن فلبوتوموس 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 صحرایی از خانواده ژربیلیده و ناقل آن فلبوتوموس پاپاتاسی است و در شهرهای اصفهان، سرخس، کاشان، اسفراین، دره گز، بافت، اهواز و اخیراً کانون جدیدی در حومه شیراز مشاهده شده است (۶-۳).

در استان کرمان شهرستان‌های بم، جیرفت، رفسنجان، شهربابک، بافت وسیرجان از کانون‌های لیشمانیوز پوستی هستند.براساس گزارش مرکز مدیریت بیماری‌ها، تعداد مبتلایان به انواع مختلف لیشمانیوز در ایران سالیانه 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 درمناطق 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 (۹-۶).

درمان اصلی بیماری، مصرف ترکیبات آنتی‌موان ۵ ظرفیتی می‌باشد که در حال حاضر از مگلومین آنتی‌مونات (گلوکانتیم) به‌صورت موضعی یا سیستمیک و اخیراً به‌صورت ترکیبی اغلب همراه با کرایوتراپی، استفاده می‌شود وگزارش‌های 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 (۱۴-۱۰،۴،۲).

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 وکشت آن صورت می‌گیرد که با توجه به پایین‌بودن 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 وتعیین گونه انگل بر اساس علایم بالینی واپیدمیولوژیکی، به دلیل آنکه ممکن است با یکدیگر و بیماری‌های پوستی دیگر اشتباه شود، روش مناسبی محسوب نمی شود. اگرچه روش ایزوآنزیم به عنوان استاندارد طلایی (Gold standard) برای تعیین‌گونه انگل استفاده می‌شود، ولی به دلیل هزینه فراوان، وقت‌گیر بودن ، نیازبه 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

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 به‌اینکه تاکنون هیچ مطالعه‌ای برروی موارد مقاوم به لیشمانیوز پوستی در بم صورت نگرفته است، ضرورت انجام این بررسی به‌منظور برنامه‌ریزی و درمان مناسب موارد، به شدت احساس می‌شود. شهر بم در ۱۸۵کیلومتری جنوب شرقی کرمان قرار داردکه 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 به‌طوری‌که در تابستان دمای آن به ۴۶c° ودر 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 ودرمان بیماری سالک در شهر بم، به‌منظور 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 به‌دنبال آن مطالعه مقاومت ژنتیکی ایزوله‌ها می‌تواند گامی اساسی برای درمان مناسب این‌گونه بیماران فراهم نموده و زمینه لازم به‌منظور دستیابی به راه‌های کنترل را تسهیل نماید .

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 ۲۱روزه 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 وپلاک‌هایی با پوسته‌های کم بوده و در موارد عود (لیشمانیوز رسیدیوانس)در همان محل قبلی، مجدداً پاپول‌های جدید پدید می‌آید (۹).

به‌علت سخت رشد بودن یا عدم رشد برخی از این نمونه‌ها درمحیط 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 ومشخصات 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 باالکل اتیلیک ۷۰٪ به‌منظور جلوگیری از عفونت‌های ثانویه باکتریال و قارچی، به کمک اسکالپل وتیغ جراحی شماره ۱۵، از حاشیه متورم و ملتهب زخم گرفته شده و گسترشی برروی لام تهیه وهمزمان نمونه دیگری به محیط کشت دوفازی (NNN) در کنار شعله تلقیح گردید. گسترش‌های مستقیم به‌وسیله الکل متیلیک فیکس وبا گیمسا رنگ‌آمیزی و ابتدا با درشت نمایی ۴۰x، سپس ۱۰۰x با استفاده از میکروسکوپ نوری جهت مشاهده آماستیگوت‌ها، مورد بررسی قرار گرفت.

محیط‌های کشت تحت شرایط سرما در جعبه یخ، به آزمایشگاه کشت گروه انگل‌شناسی دانشکده پزشکی منتقل و درانکوباتور دردمای ۲۴ ± ۲°c نگهداری و در فواصل ۳ -۲ 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 ۵۶ °c به‌مدت ۳۰ دقیقه غیرفعال شده بود، درمجاورت ۲۰۰Iu/ml پنی‌سیلین و ۲۰۰µg/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 وپس از سانتریفوژ و شستشو با بافر فسفات (PBS)، ۲۰۰µl از آن با کیت Bioneer کره به روش پروتئیناز K، استخراج گردید.

به‌علت 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 به‌ترتیب ۹۲٪ و ۱۰۰٪ می‌باشد (۲۱).

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

CSB1XR (ATTTTTCGCGATTTTCGCAGAACG)

CSB2XF (CGAGTAGCAGAAACTCCCGTTCA)

و در مرحله دوم PCR، از پرایمرهای:

LiR (TCGCAGAACGCCCCT)

13Z (ACTGGGGGTTGGTGTAAAATAG)

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

الکتروفورز و اسکن محصول PCR

مقدار ۵µl از هر محصول PCR در کنار مارکر ۱۰۰ bp، در ژل آگارز ۱/۵٪ به‌همراه اتیدیوم بروماید به‌مدت ۴۵ دقیقه در ولتاژ ۱۰۲ میلی‌آمپر الکترفورز و الگوی باندهای حاصل با دستگاه ژل داکیومنتیشن مشاهده وثبت گردید. داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS 17 و آزمون کای دو (χ^2) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت وسطح اطمینان p<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

در این بررسی، از ۲۱۲۶ نفر مبتلا به سالک مراجعه‌کننده 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

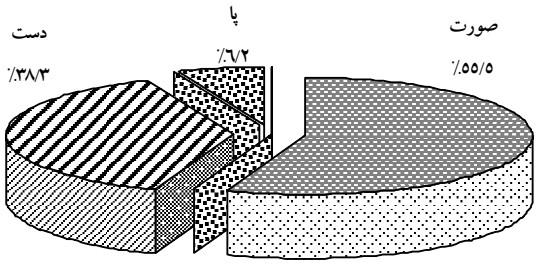
پاسخ به‌درمان در گروه سنی ۲۱-۱۱ سال (۲۹/۴٪)، سپس در گروه ۱۰≤ سال (۲۱/۶٪)، و کمترین فراوانی در گروه سنی بالای ۵۵ سال (۵/۹٪) مشاهده گردید (جدول۱).

جدول ۱. *توزیع فراوانی بیماران مقاوم به گلوکانتیم در بم در سال‌های ۸۸-۸۷ به تفکیک جنس و گروه‌های سنی*

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

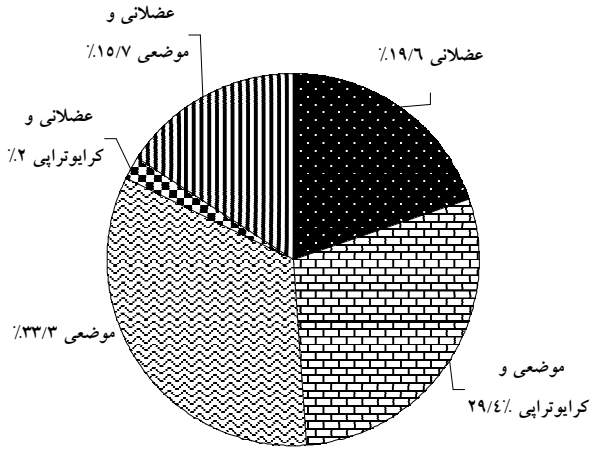
÷

اندازه ضایعات به‌طور متوسط 5Cm- ۲ و بیشتر بر روی صورت (۵۵/۵٪)، سپس در دست (۳۸/۳٪) و پا (۶/۲٪) 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 (نمودار۱).



نمودار ۱. *میزان فراوانی محل ضایعه در بیماران مقاوم به گلوکانتیم در بم در سالهای ۸۸-۸۷*

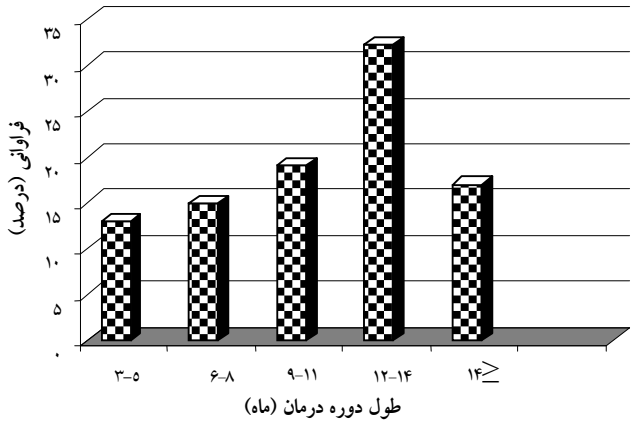
بیشترین نوع درمان در بیماران تحت مطالعه، شامل تزریق موضعی گلوکانتیم (۳۳/۳٪)، تزریق موضعی همراه با کرایوتراپی (۲۹/۴٪)، تزریق عضلانی (۱۹/۶٪)، عضلانی و موضعی (۱۵/۷٪) و عضلانی و کرایوتراپی (۲٪) می‌باشد (نمودار۲).



نمودار ۲. *میزان فراوانی بیماران مبتلا به گلوکانتیم در بم در سال‌های ۸۸-۸۷ بر حسب نوع درمان*

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

گلوکانتیم، دریافت کرده بودند. از نظر طول دوره درمـان، ۳۳/۲٪ بیماران ۱۴-۱۲ ماه، ۱۹/۶٪ از آنها ۱۱-۹ ماه ،۱۷/۶٪ بیشتر از ۱۴ماه و ۱۵/۹٪ افراد ۸-۶ ماه وتنها ۱۳/۷٪ افراد ۵-۳ ماه سیر درمانی آنها ادامه داشته است (نمودار۳).

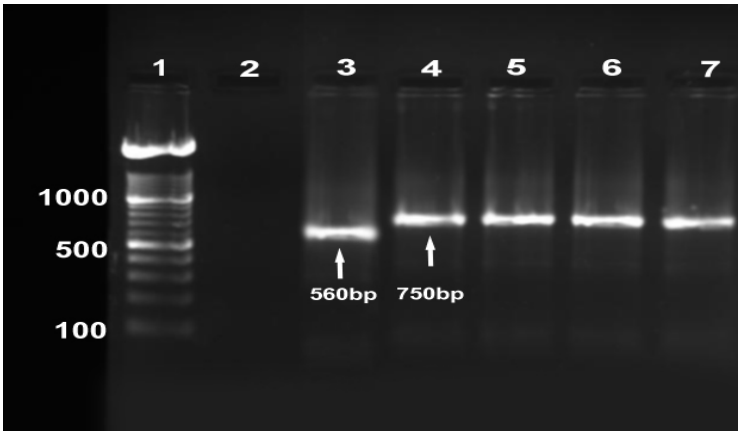


نمودار۳. *میزان فراوانی بیماران مقاوم به گلوکانتیم در بم در سالهای ۸۸-۸۷ بر حسب طول دوره درمان*

از نظر سابقه بیماری‌های مزمن همراه بـا سـالک، ۱۳٪ افراد که بیشتر آنها زنان بودند مبتلا بـه آنمـی بـوده و۲٪ دیابتیک وبقیه مشکلی نداشتند واز نظـر آمـاری اخـتلاف معنی‌داری بین جنس و سابقه بیماری مشاهده نگردید.

از نظر بروز مقاومت، بیشترین موارد درماه‌های اسفند، تیر و مهر وکمترین موارد مربوط به دی‌ماه، می‌باشد.

نتایج واکنش Nested-PCR نشان داد که تمام ایزوله‌های جدا شده از بیماران در این مطالعه، گونه لیـشمانیا تروپیکـا می‌باشند به‌جز دو ایزوله که الگوی باندی آنهـا بیـشتر یـا کمتر از ۷۵۰bp بود (شکل ۱).



شکل ۱. *تصویر نتیجه PCR ژل آگارز نمونه‌های مقاوم به گلوکانتیم در بم درسال‌های ۸۸-۸۷*

تصویر ژل بالا شامل الگوی مربوط به باندهای حاصل از انجام روش Nested-PCR بر روی ایزوله‌های مقاوم جداشده از بم 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 بم 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. باوجود 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 به‌منظور کنترل بیماری، ضرورت می‌یابد. زیرا هر نوع مطالعه‌ای برروی 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 به‌ویژه نوع شهری محسوب گردد. لیشمانیا تروپیکا منحصر به انسان (انتروپونوتیک) می‌باشد وکنترل 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 ۱۲-۱۰ سال گذشته با عدم پاسخ به درمان مواجه گشته و طبق بررسی‌های انجام شده، وجود سویه مقاوم به دارو ثابت گردیده است (۱۳-۱۱).

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 جداشده 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 ترواپیکا به دارو از نقاط مختلف گزارش شده است (۲۵-۱۳،۲۴) 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 به‌ثبت 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 به‌منطقه و توسعه صنایع و کشاورزی و اسکان افراد مهاجر در شهر تماس پشه خاکی با انسان زیاد شده وتا 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

فلبوتوموس سرژنتی 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 برروی فراوانی لیشمانیوز 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 لیشمانیوز 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 به‌دلیل 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 لیشمانیا تروپیکا و ۸/۹٪ لیشمانیا ماژور بوده است (۲۷). در بررسی انجام شده توسط شریفی و همکاران در سال ۱۳۷۴، ۱۰-۵٪ موارد لیشمانیا ماژور و بقیه لیشمانیا تروپیکا بودند (۲۹).

در تکنیک مولکولی Nested-PCR، قسمت Minicircle KDNA- دارای مناطق حفاظت‌شده و متغییر است که قسمت متغییر بسیار اختصاصی عمل کرده و هیچ واکنش متقاطعی با DNA موجود زنده دیگری ندارد. از این رو، روش بسیار حساس و دقیقی جهت تعیین گونه لیشمانیا می‌باشد (۳۲-۳۰).

به‌کارگیری روش استخراج DNA از روی گسترش لام حاوی ضایعات پوستی، علاوه بر تشخیص سریع بیماری و تعیین گونه انگل، نیاز به کشت انبوه لیشمانیا 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، لیشمانیا تروپیکا می‌باشند و تحقیقات بیشتری برای شناسایی تغییرات ژنتیکی ژنوتایپ‌های لیشمانیا تروپیکا به‌منظور 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.

Identification of Nonresponsive Isolates to Glucantime in Patients with Cutaneous Leishmanaisis 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, Mohebali 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 Bam1994- 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 , 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): 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, Johne 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, Samarbaf 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, Mohebali 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, Mohebali M. Glucantime-resistant *Leishmania tropica* isolated from Iranian patients with cutaneous leishmanisis 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* 200l; 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(suppll): 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.