

بررسی گونه های عامل لیشمانیوزیس جلدی انسان با استفاده از منوکلونال آنتی بادیهای اختصاصی در شهر مشهد

محسن ولی زاده^۱، عبدالحسین دلیمی اصل^{۲*}، عبدالمجید فتی^۳، محمود رضا جعفری^۴،
علی خامسی پور^۵، مسعود مهاجری^۶

- ۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد انگل شناسی، دانشگاه تربیت مدرس
- ۲- استاد انگل شناسی، دانشگاه تربیت مدرس
- ۳- استاد انگل شناسی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
- ۴- دانشیار مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
- ۵- استادیار مرکز آموزش و پژوهش بیماریهای پوست و جذام، دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۶- استادیار انگل شناسی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

چکیده

هدف: این مطالعه با هدف تعیین گونه لیشمانیا در افراد ساکن در شهر مشهد با استفاده از آزمایش الایزا و بررسی شکل برحسب سن و جنس، محل سکونت افراد در مشهد و در ارتباط با گونه لیشمانیا طراحی و اجرا شد.

مواد و روشها: بدین منظور ابتدا با آزمایش گسترش مستقیم و کشت از زخم ۱۵۳ نفر ابتلا به لیشمانیا بررسی، سپس با استفاده از آنتی بادی منوکلونال آزمایش الایزا بر روی نمونه های مثبت انجام گرفت.

نتایج: بدین ترتیب از ۷۲ نمونه تعیین گونه شده به روش الایزا، ۵۲ مورد (۷۲/۲۲ درصد) مربوط به *L. tropica*، ۱۶ مورد (۲۲/۲ درصد) مربوط به *L. major* و ۴ مورد (۵/۵۵ درصد) ناشناخته بوده است. از ۵۲ ایزوله تعیین شده ل. تروپیکا، ۴۹ ضایعه از نظر ظاهری به فرم خشک شبیه بودند و از ۱۶ ایزوله تعیین شده ل. ماژور، ۱۵ ضایعه از نظر ظاهری به فرم خشک نیز شباهت داشت. ۴ مورد از ۷۲ نمونه مورد بررسی نیز به عنوان سویه های ناشناخته در نظر گرفته شد. بیشترین میزان آلودگی مربوط به ناحیه دست، با ۳۲ ضایعه (۴۴/۴۴ درصد) و کمترین آن در ناحیه تنه، با ۱ ضایعه (۱/۳۸ درصد) دیده شده است. از ۷۲ بیمار مبتلا به لیشمانیوزیس، ۴۶ نفر (۶۳/۸۸ درصد) از افراد آلوده مونث و ۲۶ نفر (۳۶/۱۱ درصد) مذکر بوده اند.

بحث: در مطالعه حاضر از نظر خصوصیات بالینی و آزمایش الایزا گونه غالب ل. تروپیکا تشخیص داده شد.

کلید واژگان: لیشمانیوزیس جلدی، انسان، مشهد، گونه، منوکلونال آنتی بادی، الایزا.

۱- مقدمه

لیشمانیوزیس از جمله بیماریهای مشترک بین انسان و حیوان (زئونوز) است که علت آن تک یاخته جنس لیشمانیا می باشد. تاکنون ۲۹ گونه از این انگل شناخته شده است که ۱۷ گونه آن انسان را در کانونهای مختلف جغرافیایی آلوده می کند. عامل بیماری به وسیله گونه های پشه خاکی (جنسهای فلوتوموس و لوتومیا) منتقل می شود. تاکنون حدود ۵۰ گونه از این پشه ها به عنوان ناقلین انگل مطرح شده اند و بیش از صد گونه از حیوانات مهره دار نیز به عنوان مخزن بیماری عمل کرده و چرخه زندگی انگل را در طبیعت حفظ می کنند [۱]. معمولاً برای تعیین هویت و تشخیص لیشمانیا از ویژگیهای داخلی و خارجی ارگانیسم استفاده می شود. از جمله ویژگیهای خارجی می توان به تظاهرات بالینی و منطقه جغرافیایی که عفونت در آن دیده شده است اشاره کرد. اما این روشها به تنهایی کافی نیست به همین دلیل برای تعیین هویت انگل از ویژگیهای داخلی که در برگزیده عمل و ساختمان مولکولی ارگانیسم است، استفاده می شود. این ویژگیها عبارتند از آنتی بادیهای مونوکلونال برای شناسایی اپی توپهای اختصاصی، روش ایزوآنزیم الکتروفورز، استفاده از PCR (Polymerase Change Reaction) و روش چگالی شناوری DNA می باشد [۲].

از طرفی از آنجا که تاکنون مطالعات دقیقی درباره وضعیت گونه های لیشمانیوزیس در مشهد صورت نگرفته و همچنین شناخت بیماری تنها بر مبنای شواهد بالینی بوده است و در سالهای اخیر تنها در یک تحقیق از وجود گونه لیشمانیا ماژور در یک کانون در حاشیه شهر مشهد با استفاده از آزمایش ایزو آنزیم گزارش شده است [۳]، لذا مطالعه حاضر در راستای تعیین دقیق گونه لیشمانیا با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال به عنوان هدف اصلی و بررسی خصوصیات دموگرافیک بیماران به عنوان اهداف فرعی، طراحی و اجرا شد.

۲- مواد و روشها

۲-۱- جامعه مورد مطالعه

در این مطالعه از ۱۵۳ بیمار مبتلا به زخم جلدی مشکوک به لیشمانیوزیس که با همکاری طرح خانه به خانه بسیج سلامت و بیماریابی سالک در مشهد و حومه طی تیر الی بهمن ۸۱ به بیمارستان امام رضا (ع) معرفی شده بودند نمونه برداری به عمل آمد.

۲-۲- گونه های استاندارد

ایزوله های استاندارد مربوط به ل. تروپیکا با کد MHOM/IR/NADIM3 و ل. ماژور با کد MRHO/IR/76/ER اینفانتوم با کد MHOM/In/80/DD8 را از مرکز آموزش و پژوهش بیماریهای پوست و جذام ایران دریافت شد.

۲-۳- آنتی بادیهای منوکلونال

از آنتی بادیهای منوکلونال اختصاصی برای گونه های ل. ماژور (T_9, T_1)، ل. تروپیکا (T_{10}, A_{11})، ل. دنوانی (D_2) و T_7 برای ل. تروپیکا و ل. ماژور استفاده شد. این آنتی بادیهای استاندارد متعلق به سازمان بهداشت جهانی بوده و از مرکز آموزش و پژوهش بیماریهای پوست و جذام ایران دریافت شد.

۲-۴- نحوه نمونه برداری و تکثیر انگل

ابتدا از حاشیه زخم بیماران، نمونه برداشت شد و بر روی لام گسترش تهیه و با گیمسا رنگ آمیزی شد. سپس در شرایط استریل، با کمک تیغه بیستوری از حاشیه زخم برداشت و به محیط کشت NNN انتقال داده شد. محیط مذکور را در دمای $25^{\circ}C$ قرار داده و پس از ۴۸-۷۲ ساعت رشد انگل بررسی شد. برای تکثیر بیشتر، ابتدا انگل را به محیط کشت $RPMI_{164}$ بدون سرم جنین گوساله و بعد از رشد اولیه انگل، آن را به محیط کشت حاوی $RPMI_{164}$ ۱۰-۲۰ درصد سرم جنین گوساله غیر فعال شده انتقال داده شد [۴].

۱- محتویات میکروپلیت‌ها را پس از گذشت زمان یک شب خالی کرده تا آنتی ژنهای اضافی خارج شود؛ سپس آن را با بافر شستشودهنده شستشو داده سپس بافر مسدود کننده BSA ۵ درصد به هر چاله اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در انکوباتور 37°C قرار داده شد.

۲- بعد از آن چاله‌ها را با بافر شستشو ۳-۴ بار شستشو داده و $50\mu\text{l}$ از آنتی بادی مونوکلونال ل. تروپیکا، ل. ماژور و اینفانتوم $1/1000$ رقیق شده با BSA ۵ درصد در هر چاله ریخته و به مدت یک ساعت در 37°C قرار داده شد.

۳- میکروپلیت را ۴-۵ بار با بافر شستشو داده و آنتی ایمنوگلوبولین موشی کونژوگه شده با پراکسیداز رقیق شده با BSA ۵ درصد را در هر چاله ریخته و به مدت یک ساعت در 37°C قرارداده شد.

۴- با استفاده از بافر شستشو ۴-۵ بار میکروپلیت را شسته و در شرایط تاریکی سوبسترا- کروموزن تترامتیل بنزیدین را در هر چاله ریخته و به مدت ۱۵-۲۰ دقیقه در درجه حرارت اطاق قرار داده شد.

۵- به هر چاله $50\mu\text{l}$ اسید سولفوریک یک مولار (محلول متوقف کننده) اضافه کرده و سپس دانسیته نوری را با کمک دستگاه الایزا ریدر در طول موج 450 nm اندازه گیری شد [۴]. در این مطالعه میانگین ODهای قرائت شده به اضافه سه برابر انحراف معیار آنها به عنوان Cut off در نظر گرفته شد.

۳- نتایج

در این بررسی از بین ۱۵۳ نفر بیمار مشکوک به لیشمانیا تعداد ۹۳ بیمار از نظر لام و کشت اولیه مثبت شدند و از این میان تعداد ۷۲ نمونه بیمار به مرحله کشت انبوه رسید و برای ادامه مطالعات استفاده گشت. طیف سنی افراد آلوده از یکسال و هفت ماه تا ۹۷ سال متغیر بوده است. این افراد در مناطق شهری از قبیل رضاشهر، سیدی، پائین شهر (منطقه طلاب)، آب و برق، بلوار وکیل آباد، خواجه ربیع ۳۵ نفر (۴۸/۶۱ درصد) و در مناطق روستایی از قبیل همت آباد، کال زرکش، جاده قدیم قوچان، سپس آباد و روستای چنارک تعداد ۳۷ نفر (۵۱/۳۸ درصد) ساکن هستند.

۲-۵- جداسازی انگل از محیط کشت

برای انجام آزمایش الایزا تعداد انگل باید حداقل 1×10^7 انگل در هر میلی لیتر باشد. بعد از شمارش انگل، محتویات فلاسک کشت در شرایط استریل به لوله‌های سانتریفوژ انتقال داده و در ۱۰ میلی لیتر محلول بافر فسفات سالین استریل^۱ در دور ۳۵۰۰ به مدت ۷ دقیقه سه بار شستشو شد. سپس یک میلی لیتر محلول PBS استریل را به رسوب مرحله سوم اضافه کرده و تمام آنها را به لوله های اپندورف اضافه شد [۴].

۲-۶- روش انجام آزمایش الایزا

در این تحقیق هم از انگل تام و هم از آنتی ژن محلول برای آزمایش الایزا استفاده شد.

۲-۶-۱- انگل تام

ابتدا انگل تام را با غلظت 1×10^6 در هر چاله انگل با محلول بافر فسفات سالین (PBS) آماده شد. سپس $50\mu\text{l}$ از سوسپانسیون آماده شده را در هر چاله میکروپلیت خالی کرده و به مدت یک شب در 4°C نگهداری شد [۴].

۲-۷- آنتی ژن محلول

انگل و PBS را در لوله‌های اپندورف ریخته، لوله‌های اپندورف را برای ۶-۱۰ بار به ترتیب در سرمای 70°C سپس آب جوش قرار داده تا انگل کاملاً شکسته شود؛ سپس سوسپانسیون آماده شده را در دور ۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ کرده و پروتئین محلول رویی را به وسیله روش براد فورد اندازه گیری شد. سپس میزان پروتئین هر نمونه با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تنظیم گردید. $50\mu\text{l}$ از سوسپانسیون آماده شده آنتی ژن را در هر چاله تخلیه کرده و به مدت یک شب در 4°C نگهداری شد [۴].

۲-۸- آزمایش الایزا

طبق جدول ۱، آزمایش الایزا نشان داد که ۵۲ نفر (۷۲/۲۲ درصد افراد) آلوده به گونه ل. تروپیکا، ۱۶ نفر (۲۲/۲۲ درصد) آلوده به گونه ل. ماژور و ۴ نفر (۵/۵۵ درصد) آلوده به فرم ناشناخته بوده اند. منظور از فرم ناشناخته این است که ۳ مورد از آنها با هر دو آنتی بادی اختصاصی لیشمانیا تروپیکا *L. tropica* و لیشمانیا اینفنتوم *L. infantum* و یک مورد از آنها که با هر دو آنتی بادی اختصاصی *L. major* لیشمانیا ماژور *L. infantum*، واکنش نشان دادند.

جدول ۱ - توزیع فراوانی نسبی و مطلق گونه های لیشمانیا تعیین شده به روش مونوکلونال آنتی بادی در مبتلایان به لیشمانیوزیس جلدی در شهرستان مشهد در سال ۱۳۸۱

گونه های تعیین شده	لیشمانیا تروپیکا	لیشمانیا ماژور	لیشمانیای ناشناخته	جمع کل
فراوانی	۵۲	۱۶	۴	۷۲
درصد	۷۲/۲۲	۲۲/۲۲	۵/۵۵	۱۰۰

مطابق جدول ۲ از ۷۲ بیمار بررسی شده، ۴۹ نفر (۷۳/۱۳ درصد) از افراد به لیشمانیوزیس فرم خشک با گونه ل. تروپیکا و ۱۵ نفر (۲۲/۳۸ درصد) با گونه ل. ماژور آلوده بوده اند. ۳ نفر (۶۰ درصد) از افراد به لیشمانیوزیس فرم مرطوب با گونه ل. تروپیکا و ۱ نفر (۲۰ درصد) با گونه ل. ماژور آلوده بوده اند.

جدول ۲ - توزیع فراوانی نسبی و مطلق گونه های لیشمانیا در مبتلایان به لیشمانیوزیس جلدی بر حسب فرمهای خشک و مرطوب در شهرستان مشهد در سال ۱۳۸۱

گونه های تعیین شده								فرم زخم
لیشمانیا تروپیکا		لیشمانیا ماژور		لیشمانیای ناشناخته		جمع کل		
درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	
۷۳/۱۳	۴۹	۲۲/۳۸	۱۵	۴/۴۷	۳	۹۳/۰۵	۶۷	خشک
۶۰	۳	۲۰	۱	۲۰	۱	۶/۹۴	۵	مرطوب
۷۲/۲۲	۵۲	۲۲/۲۲	۱۶	۵/۵۵	۴	۱۰۰	۷۲	جمع

مطابق جدول ۳، تعداد ۴۴/۴۴ درصد ضایعات روی دست، ۳۰/۵۵ درصد ضایعات روی صورت، ۲۳/۶۱ درصد ضایعات روی پا و ۱/۳۸ درصد ضایعات روی بدن مشاهده شد و بیشترین میزان آلودگی در روی دست دیده شد.

جدول ۳ - توزیع فراوانی نسبی و مطلق گونه های لیشمانیا در مبتلایان به لیشمانیوزیس جلدی بر حسب محل زخم در شهرستان مشهد در سال ۱۳۸۱

گونه های تعیین شده								محل زخم
جمع کل		لیشمانیای ناشناخته		لیشمانیا ماژور		لیشمانیا تروپیکا		
درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	
۳۰/۵۵	۲۲	۴/۵۴	۱	۱۸/۱۸	۴	۷۷/۲۷	۱۷	صورت
۲۳/۶۱	۱۷	۵/۸۸	۱	۲۹/۴۱	۵	۶۴/۷۰	۱۱	پا
۴۴/۴۴	۳۲	۶/۲۵	۲	۱۸/۷۵	۶	۷۵	۲۴	دست
۱/۳۸	۱	۰	۰	۱۰۰	۱	۰	۰	تنه
۱۰۰	۷۲	۵/۵۵	۴	۲۲/۲۲	۱۶	۷۲/۲۲	۵۲	جمع

جدول ۴ توزیع فراوانی نسبی و مطلق گونه های لیشمانیا در مبتلایان به لیشمانیوزیس جلدی بر حسب جنس افراد در شهرستان مشهد در سال ۱۳۸۱

گونه های تعیین شده								جنس بیماران
جمع کل		لیشمانیای ناشناخته		لیشمانیا ماژور		لیشمانیا تروپیکا		
درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	
۳۶/۱۱	۲۶	۷/۶۹	۲	۲۳/۰۲	۶	۶۹/۲۳	۱۸	مرد
۶۳/۸۸	۴۶	۴/۳۴	۲	۲۱/۸۳	۱۰	۷۳/۹۱	۳۴	زن
۱۰۰	۷۲	۵/۵۵	۴	۲۲/۲۲	۱۶	۷۲/۲۲	۵۲	جمع

مطابق با جدول ۴، از ۷۲ بیمار مبتلا به لیشمانیوزیس پوستی ۴۶ نفر (۶۳/۸۸ درصد) از افراد آلوده مونث و ۲۶ نفر (۳۶/۱۱ درصد) از افراد آلوده مذکر مشاهده شد و بیشترین میزان آلودگی در افراد مونث دیده شده است.

گزارش شده است. فرم خشک در شهرهای مشهد، نیشابور، سبزوار و... و فرم مرطوب در شهرهای سرخس، لطف آباد و اسفراین دیده شده است [۸،۷،۶،۵] جواهری - مهاجری و همکاران در سال ۱۳۸۰ روی ۷۷ بیمار مبتلا به ضایعات جلدی

۴- بحث

طبق تحقیقات انجام شده در سالهای گذشته در استان خراسان، هر دو فرم لیشمانیوزیس جلدی خشک و مرطوب در این استان

آنتی بادی اختصاصی *L.major* و *L.infantum* واکنش دادند و ۵ سویه نیز با هیچکدام از آنتی بادیهای مورد آزمایش واکنش نشان ندادند [۴].

استفاده از آنتی بادیهای مونوکلونال برای شناسایی گونه های لیشمانیا در کشورهای دیگر نیز انجام گرفته است [۱۲-۱۹]. در مطالعه حاضر، از ۷۲ نمونه تعیین گونه شده به روش الایزا، ۵۲ مورد (۷۲/۲۲ درصد) مربوط به گونه *L.tropica*، ۱۶- مورد (۲۲/۲ درصد) مربوط به *L.major* و ۴ مورد (۵/۵۵ درصد) ناشناخته اعلام شد. ۴ مورد از ۷۲ نمونه مورد بررسی به عنوان سویه های ناشناخته شناسایی شد که ۳ مورد از آنها از نظر ظاهری شبیه به فرم خشک و با هر دو آنتی بادی اختصاصی *L.tropica* و *L.infantum* واکنش نشان داد و یک مورد از آنها که با هر دو آنتی بادی اختصاصی *L.major* و *L.infantum* پاسخ یکسان و غیر قابل تمایز داشته و از نظر ظاهری نیز به فرم مرطوب شباهت داشت. در مورد چنین سویه هایی که در مقابل هر دو آنتی بادی یا سه آنتی بادی پاسخ داده اند می توان چنین اظهار نظر کرد که با توجه به اینکه آنتی بادیهای مونوکلونال استفاده شده مورد تأیید سازمان جهانی بهداشت بوده و در تجربیات به دست آمده مشخص شده که هر آنتی بادی تنها برای یک گونه اختصاصی است احتمال دارد موارد ناشناخته گونه و یا سویه جدیدی از انگل در این منطقه باشد.

از نظر خصوصیات دموگرافیکی بیماران مبتلا به لیشمانیوزیس پوستی، در مطالعاتی که از سوی مهاجری و همکاران در دانش آموزان مدارس راهنمایی شهر مشهد در سال ۱۳۸۰ انجام

مشکوک در منطقه کوی آب و برق مشهد مطالعاتی انجام دادند. از این تعداد فقط ۱۸ مورد به کشت انبوه رسید که در کنار نمونه های استاندارد ل. ماژور و ل. تروپیکا و با استفاده از ۶ سیستم آنزیمی و الکتروفورز مقایسه و ارزیابی شدند. با توجه به ۶ سیستم آنزیمی مورد مطالعه، هر ۱۸ نمونه مجهول ل.ماژور شناخته شدند که تنها یکی از نمونه ها زایموم متفاوتی از ل.ماژور شناسایی شد [۱]. در هیچ کدام از تحقیقات صورت گرفته در مشهد از روشهای الایزا و آنتی بادیهای مونوکلونال برای تعیین گونه استفاده نشده است؛ ولی از این روشها برای تعیین گونه لیشمانیا در برخی مناطق کشور استفاده شده است. در مطالعه انجام شده به وسیله حاتم در سال ۱۳۷۵ به منظور تعیین گونه لیشمانیای شایع در اصفهان، که از آنتی بادیهای مونوکلونال اختصاصی برای تعیین *L.major* (T₁)، *L.tropica* (A₁₁) و *L.infantum* (D₂) استفاده نموده بود، از ۳۸ انگل جدا شده از بیماران اصفهانی، ۳۶ مورد (۹۴/۷ درصد) *L.major* و ۱ مورد (۲/۶ درصد) *L.tropica* و ۱ مورد (۲/۶ درصد) *L.infantum* شناسایی شد. روش آزمایشگاهی مورد استفاده در این تحقیق آزمایش الایزا بود [۱۰]. شریفی و همکاران نیز در سال ۱۳۷۶ با استفاده از آنتی بادیهای مونوکلونال اختصاصی برای *L.major* (T₁) و *L.tropica* (T₁₁, T₁₅, T₁₄) و آزمون الایزا، گونه های عامل لیشمانیوزیس جلدی را در ۱۱۰ بیمار در شهرهای رفسنجان و کرمان تعیین کردند در مطالعه مذکور در ۹۶ درصد از بیماران *L.tropica* و در ۴ درصد آنها *L.major* مشاهده شد [۱۱]. در مطالعه اردهالی و همکاران در سال ۱۳۷۶ نیز نتیجه مشابه ای مشاهده شد این محققین با استفاده از آنتی بادیهای مونوکلونال، ۱۵۵ نمونه انگل لیشمانیای جدا شده از بیماران مبتلا به لیشمانیوزیس جلدی را پس از رشد انبوه و تهیه آنتی ژن با روشهای ایمونوفلورسانس والایزا مورد بررسی قرار دادند. از مجموع ایزوله های بررسی شده، ۳۰ نمونه از شیراز، ۲۸ نمونه از کرمان و ۹۸ نمونه از تهران بوده اند، که از این تعداد ۶۳ نمونه با آنتی بادی اختصاصی *L.tropica* (A₁₁)، ۷۲ نمونه با آنتی بادی اختصاصی *L.major* (T₁) و ۳ نمونه با آنتی بادی اختصاصی *L.donovani* (D₂) واکنش دادند. از ۱۷ نمونه باقیمانده، ۶ مورد با آنتی بادی اختصاصی *L.major* و *L.tropica*، ۵ مورد با دو آنتی بادی اختصاصی *L.tropica*، *L.infantum*، یک مورد با دو

۵- تشکر و قدردانی

این تحقیق با مساعدت سازمان بهداشت جهانی و با همکاری دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، دانشگاه علوم پزشکی مشهد و مرکز آموزش و پژوهش بیماریهای پوست و جدام دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفت. نویسندگان از خانم دکتر غفاری فر و آقای دکتر فتاحی بافقی و آقای دکتر محمود شریفیان از گروه انگل شناسی دانشگاه تربیت مدرس به خاطر مساعدت و راهنماییهای علمی، آقای سید ابراهیم اسکندری و خانم اکرم محمدی از مرکز آموزش و پژوهش بیماریهای پوست و جدام، آقایان محمد مهدی اکبری و مجید گنج بخش از آزمایشگاه انگل شناسی بیمارستان امام رضا (ع) مشهد علی اکبر قربانی و محسن عارف نژاد به خاطر مساعدت-های اجرایی و علمی کمال تشکر و سپاس را دارند.

داد، ایشان تفاوت معناداری بین دو جنس مشاهده نکردند [۲۰]. در مطالعه نصری فر در سال ۱۳۷۸ از مجموع ۲۹۸ بیمار ۱۳۴ نفر (۴۵ درصد) مونث و ۱۶۴ نفر (۵۵ درصد) مذکر بودند [۲۱]. در مطالعات انجام شده توسط الهی و همکاران در سال ۱۳۶۸ در مشهد، زنها ۴۶/۸ درصد و مردها ۵۳/۲ درصد موارد مطالعه شده را تشکیل می دادند [۵]. در تحقیق حاضر نسبت آلودگی بیشتر در خانمها ۴۶ نفر (۶۳/۸۸ درصد) دیده شد در حالی که غالباً نسبت آلودگی در مردها بیشتر گزارش می شود. براساس نتایجی که در تحقیق حاضر به دست آمده است، بیشترین محل های آلودگی در روی دست با ۳۲ ضایعه (۴۴/۴۴ درصد) بوده است. به طور کلی عفونت غالب در مشهد نوع لیشمانیا تروپیکا می باشد و با توجه به اینکه تفاوتی بین تشخیص به روش الایزا و تظاهرات ظاهری دیده می شود، بنابراین انجام تستهای اختصاصی برای تشخیص لیشمانیوز پوستی ضروری می باشد.

۶- منابع

[۱] جواهری آ. تعیین هویت گونه های لیشمانیوزیس جلدی به روش ایزوآنزیم الکتروفورزیس در شهر مشهد. پایان نامه کارشناسی ارشد انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ۱۳۸۰؛ صفحه ۱-۴۰.

[2] WHO Control of the Leishmaniasis, Technical Report Series. Geneva: WHO, 1990; 1990;793: Geneva.

[۳] مهاجری م، حاتم غ ر، جواهری آ، شمسیان ع ا. بررسی

وجود لیشمانیا در مبتلایان به لیشمانیوز جلدی در شهر مشهد ارائه شده در همایش تازه های لیشمانیوز جلدی و پوست، کتاب خلاصه مقالات، انتشارات علوم پزشکی اصفهان، اردیبهشت ۱۳۸۲؛ صفحه ۴۲.

[4] Ardehali S, Moattari A, Hatam GR, Hosseini SMH and Sharifi I. Characterization of Leishmania isolated in Iran: 1. Serotyping with species specific monoclonal antibodies. Acta Tropica 2000; 75: 301-7.

[۵] صائی ا. بیماریهای انگلی در ایران- بیماریهای تک یاخته ای. چاپ ششم، تهران: موسسه فرهنگی- انتشاراتی حیان، ۱۳۷۷؛ صفحه ۱۶۳-۱۷۹.

[۶] الهی ر، فتی ع و برنجی ف. مقایسه روشهای تشخیصی آزمایشگاهی سالک. مجله دانشکده پزشکی؛ دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ۱۳۷۴؛ شماره (۴۷): سال ۳۸، صفحه ۶۲-۶۸.

[۷] برنجی ف. مقایسه تست جلدی لیشمانین با آزمایشهای مستقیم، کشت و بیوپسی در تشخیص لیشمانیوز جلدی. پایان نامه شماره ۴۷۶- ت، برای دریافت تخصص انگل - شناسی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد؛ ۱۳۷۲.

- [۸] فتی ع م ، الهی ر. بررسی کانونهای جدید لیشمانیوز در مشهد. مقاله ارائه شده در اولین کنگره بیماریهای عفونی و گرمسیری و کاربرد آنتی بیوتیکها، کتاب خلاصه مقالات، انتشارات علوم پزشکی اصفهان؛ ۱۳۶۷.
- [۹] ندیم ا، جوادیان ع ، سیدی رشتی م ع. همه گیری شناسی لیشمانیوزها در ایران. کتاب اردهالی ص، رضایی ح ر و ندیم ا. انگل لیشمانیا و لیشمانیوزها. مرکز نشر دانشگاهی، تهران؛ ۱۳۷۳؛ ص ۱۷۶-۲۰۸.
- [۱۰] حاتم غ. تعیین انگل لیشمانیا با روش ایزوآنزیم الکتروفورس. زیست. پایان نامه دکترای تخصصی Ph.D رشته انگل شناسی، دانشگاه تربیت مدرس؛ ۱۳۷۵.
- [۱۱] شریفی ا، زارع زاده م ، فکری ع ر. تعیین هویت گونه های عامل لیشمانیوز جلدی در شهر رفسنجان و کرمان با استفاده از پادتنهای تک دودمانی. دومین کنگره سراسری بیماریهای انگلی ایران؛ ۱۳۷۶.
- [12] Frank C. *Leishmania Tropica & Leishmania infantum* Respon-Sible for Cutaneous Leishmaniasis in Greece. *Trans Roy Trop Med Hyg* 1993; 87: 184-5.
- [13] Mimori T, Griboldi G, Kreutzer RD, Gomez EA. Identification, sing isoenzyme electrophoresis and monoclonal antibodies of leishmania isolated from humans and wild animals of Ecuador . *Am J Trop Hyg* 1989; 40(2): 154-8.
- [14] Anamaria DV, Rolando E, Howard A. *Leishmania mexicana* complex: Human infections in the republic of panama. *Am J Trop Med Hyg* 1990; 43(6): 619.
- [15] McMahan-pratt D, Bennett E, Grimaldi G Jaffe CL. Subspecies and species-species antigens of *Leishmania mexicana* characterized by monoclonal antibodies. *J Immunol* 1985; 134:1935- 40.
- [16] Romero GG, Arana M, Lopez M, Montoya I. Characterization of leishmania soecies from peru. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987; 81: 14-24.
- [17] Velasco O, Savarino SJ, Walton BC. Diffuse Cutaneous Leishmaniasis in mexico. *Am J Trop Med Hyg*. 1989; 41(3): 280-8.
- [18] Frank E D, Lucas CM, Torar AA, Kruger J H. Diffuse Cutaneous Leishmaniasis aquired in peru . *Am J Trop Med Hyg* 1990; 43(3): 260-2.
- [19] Keutzer RD, Corredor A, Grimaldi G Morales A. Characterization of *Leishmania colombiensis* sp.n. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a new parasite infecting humans, animals, and phlebotomine sandflies in Colombia and panama. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 44(6): 662-75 .
- [۲۰] مهاجری م، بلورساز م، شمسیان ع ا. بررسی شیوع لیشمانیوز در دانش آموزان مدارس راهنمایی شهر مشهد. مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، شماره (۷۲)، سال چهل و چهارم، ۱۳۸۰؛ صفحه ۵۴-۶۰.