ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۷، شماره٤، مهر و آبان ١٤٠١(شماره پی در پی ١٥٣)

مقاله پژوهشی

تعیین گونه‌های مولد لیشمانیوز جلدی در استان کهگیلویه و بویراحمد با روش مولکولی: یک مطالعه گذشته نگر

نصیر عارف خواه، ساسان شفیعی، امین اله سعادت نیا، عبدالعلی مشفع*

مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

تاریخ وصول: ١٤٠١/٠٢/١٨ تاریخ پذیرش: ١٤٠١/٠٥/٠٤

چکیده

زمینه و هدف: لیشمانیوز جلدی یا سالک، در ایران به وسیله دو گونه از انگل لیشمانیا شامل *L.major* و *L.tropica* ایجاد می‌شود. در طی سال‌های اخیر، این بیماری در مناطق مختلف استان کهگیلویه و بویراحمد گزارش شده است. با توجه به تفاوت‌های فاحش در نوع مخازن حیوانی و ناقل بیولوژیک، شناسایی عامل ایجاد کننده بیماری می‌تواند در برنامه‌ریزی‌های لازم جهت کنترل بیماری مؤثر باشد. لذا هدف از این مطالعه تعیین گونه‌های مولد لیشمانیوز جلدی در استان کهگیلویه و بویراحمد با روش مولکولی: یک مطالعه گذشته نگر بود.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی مقطعی و گذشته نگر برای تعیین گونه لیشمانیا، تعداد ٥٢ نمونه لام رنگ‌آمیزی شده با رنگ گیمسا از آزمایشگاه‌های مختلف در سطح شهرهای استان، بین سال‌های ١٣٩٣ تا ١٣٩٧ جمع‌آوری و با استفاده از میکروسکوپ نوری از نظر وجود جسم لیشمن بررسی شدند. پس از استخراج *DNA* موجود در سطح لام‌ها، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *LINR4* و *LIN17* با روش PCR گونه انگل لیشمانیا شناسایی گردید. داده‌ها با استفاده از آزمون آماری کای اسکور تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: از کل ٥٢ نمونه با زخم‌های لیشمانیوز جلدی، ٢٦ نمونه(٥٠ درصد) مربوط به افراد مذکر و ٢٦ نمونه(٥٠درصد) مربوط به افراد مؤنث بودند. میانگین سن افراد در مطالعه ٢٣/٣٢ سال(با انحراف‌معیار١٨/٤٢±) بود. از کل ٥٢ نمونه، آماستیگوت انگل(جسم *Leishman*) در ٣٦ مورد(٦٩/٢ درصد) آنها با مشاهده مستقیم به کمک میکروسکوپ نوری رویت شد و ٤٣ نمونه(٨٢/٧ درصد) در *PCR* مثبت شد. گونه آلوده کننده در تمامی افراد ساکن دهدشت و یاسوج *L.major* و در گچساران *L.tropica* بود.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که گونه‌ی *L.major* عامل لیشمانیوز جلدی در دهدشت و یاسوج و گونه‌ی *L.tropica* در گچساران می‌باشند. بنابر این مبارزه با مخازن حیوانی و قطع زنجیره انتقال بر اساس نوع انگل به دست آمده در این تحقیق مورد نیاز است.

واژه‌های کلیدی: لیشمانیوز جلدی، گونه، لیشمانیا تروپیکا، لیشمانیا ماژور

***نویسنده مسئول: عبدالعلی مشفع،** یاسوج، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی

Email:amoshfea@yahoo.com

مقدمه

بیماری سالک(لیشمانیوز جلدی) از قدیم‌الایام در ایران شایع بوده و در کتب قدیم ایران از جمله کتاب قانون ابوعلی سینا، از زخمی یاد شده به نام "خیرونیه" که مدت‌ها دوام داشته و درمانش مشکل و در برابر داروهای گوناگون مقاوم بوده است. با نشانه‌ها و علایمی که از این زخم ذکر شده است، تصور می‌رود که زخم سالک باشد(۱).

لیشمانیوز جلدی یک بیماری مزمن پوستی است که در اطراف شیراز به آن سالک، و در مشهد به آن لکه سال گفته می‌شود. این بیماری به ویژه در فصول گرم سال و در مناطق گرمسیر کشور، بیشترمشاهده می‌گردد. بیماری سالک یکی از بیماری‌های مشترک بیم انسان و دام[1] می‌باشد که قابل انتقال بین انسان و تعدادی از حیوانات از جمله جوندگان و سگ است و به وسیله گونه‌های مختلف پشه خاکی از فرد بیمار یا مخازن حیوانی، به دیگران انتقال می‌یابد(۲).

عامل این بیماری یک تک یاخته‌ای از جنس لیشمانیا و از خانواده *Trypanosomatidae* می‌باشد. سیر بیماری سالک به این صورت است که ابتدا به صورت یک برجستگی کوچک(پاپول) که بعد بزرگتر(ندول) می‌شود و به صورت زخم در می‌آید. زخم‌های این بیماری خود به خود ظرف چند هفته تا چند ماه و گاهی یک سال و یا بیشتر بهبود می‌یابند. در برخی از افراد عود بیماری پس از بهبودی به صورت زخم و یا برجستگی کوچک در محل زخم بهبود یافته‌ی قبلی، ظاهر می‌شود(۳ و۲).

این بیماری یکی از مهم‌ترین و شایع‌ترین بیماری‌های بومی ایران و بعد از مالاریا، دومین بیماری انگلی قابل سرایت به وسیله بندپایان است که به دو نوع شهری(خشک) و روستایی(مرطوب) دیده می‌شوند. عامل سالک شهری(خشک) *Leishmania tropica* و عامل سالک روستایی(مرطوب) *Leishmania major* می‌باشد(٤ و۳).

سالانه ۱/۵۰۰/۰۰۰ نفر در دنیا به این بیماری مبتلا می‌شوند که بسیاری از آنها ثبت و گزارش نمی‌شوند. این بیماری در برخی موارد ایجاد ضایعات متعدد(تا بیش از ۳۰۰ عدد) کرده است. اگرچه سالانه حدود بیست هزار مورد بیماری لیشمانیوز جلدی در ایران گزارش می‌شود، ولی احتمالاً موارد حقیقی بیش از ٤ تا ٥ برابر آن است. نوع روستایی اکثراً در مناطق روستایی ۱۵ استان کشور شایع است و نوع شهری در بسیاری از نقاط شهری به صورت اندمیک از جمله شهر بم وجود دارد. در سال ۱۳۸۹شهرهای شیراز، مشهد، اصفهان و استان‌های گلستان، کرمان، خوزستان، ایلام، یزد، سیستان و بلوچستان، سمنان، قم، خراسان شمالی و بوشهر بیشترین موارد آلودگی را داشته‌اند. بالغ بر ۸۰ درصد موارد سالک کشور نوع روستایی می‌باشد. سالک نوع شهری در شهرهای

1-**Zoonosis**

مشهد، شیراز، تهران، کرمان، نیشابور، یزد، بم وجود دارد که ممکن است در هر منطقه شهری دیگر نیز رخ دهد. سالک نوع روستایی در مناطقی از اصفهان، فارس، خوزستان، کرمان، گلستان، خراسان رضوی، خراسان شمالی، بوشهر، هرمزگان، سمنان، سیستان و بلوچستان، یزد و ایلام وجود دارد(۵).

تشخیص بیماری سالک با مشاهده میکروسکوپی لام‌های رنگ‌آمیزی شده با گیمسا و رایت جسم لیشمن انجام می‌شود، اما شناسایی دقیق گونه‌ی انگل با این روش امکان‌پذیر نمی‌باشد(٦). با روش‌های مولکولی از جمله روش *PCR*، هم تشخیص لیشمانیوز(در موارد تعداد کم انگل) و هم تعیین گونه انگل امکان‌پذیر شده است(۷).

با توجه به خصوصیات بیولوژیک عوامل انگلی لیشمانیوز جلدی، نوع مخازن، ناقلین و روش‌های مبارزه با این دو نوع بیماری، متفاوت می‌باشد. از آنجایی که گونه‌های لیشمانیوز از نظر ریخت‌شناسی حتی با استفاده از میکروسکوپ نوری قابل افتراق نیستند، لذا روش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی می‌تواند روش بسیار مناسبی برای تعیین گونه‌ی انگل باشد.

در پژوهش‌های متعددی گونه‌های انگل لیشمانیا در بیماران شناسایی شده است. در شیراز ۹۵/٦۱ درصد نمونه‌ها *L.major*، ۳/۹ درصد *L.tropica* و ۰/٤۹ درصد *L.infantum* گزارش شدند(۸). در دامغان تمامی نمونه‌ها گونه‌ی *major* بودند(۹). در استان قم نیز تمامی نمونه‌ها گونه‌ی *L.major* گزارش شدند(۱۰). در شهرستان پل دختر، ۱۲۹ نمونه *L.tropica* و ٤۹ مورد *L.major* بودند(۱۱). در قسمت شمالی استان خراسان ۳۵ درصد *L.major* و ٦۵ درصد *L.tropica* گزارش شدند(۱۲). در شهر ورزنه استان اصفهان، تمامی موارد *L.major* گزارش شدند(۱۳). در استان یزد، از ۱۰٤ نمونه، ۵۰ مورد *L.major*، ۵۲ مورد *L.tropica* و ۲ مورد ناشناخته گزارش شده است(۱٤). در استان گلستان، از ۳٦۰ مریض مشکوک به لیشمانیوز جلدی، در بررسی مولکولی ۱۸٦ نمونه لیشمانیوز جلدی روستایی، ٤ نمونه لیشمانیوز جلدی شهری و ۱۷۰ نمونه بدون آلودگی گزارش شدند(۱۵). در استان‌های صلاح‌الدین و بغداد عراق، بیشترین عامل آلودگی *L.tropica* و *L.major* و کمترین عامل نیز *L.aethiopica* بود(۱٦). با توجه به این که بیماری سالک در استان کهگیلویه و بویراحمد شایع می‌باشد(۱۷) و بیماران متعددی با زخم جلدی به مراکز درمانی و تشخیصی مراجعه می‌نمایند و همچنین عدم اطلاع از گونه‌ی لیشمانیای مسبب این بیماری، این مطالعه انجام شد. با شناخت گونه‌ی انگل لیشمانیا نه تنها می‌توان این بیماری را از سایر بیماری‌های پوستی متمایز کرد، بلکه تعیین دقیق گونه‌های لیشمانیا جهت انجام پژوهش‌های اپیدمیولوژی به منظور تعیین ناقل اصلی، مخزن قطعی و انتخاب استراتژی مناسب جهت

کنترل و پیش‌گیری، کاربرد دارد. لذا هدف از این پژوهش، یک مطالعه گذشته نگر با روش مولکولی برای تعیین گونه‌های مولد لیشمانیوز جلدی در استان کهگیلویه و بویراحمد بود.

روش بررسی

این مطالعه یک مطالعه مقطعی توصیفی ـ گذشته‌نگر است که بر روی لام‌های رنگ‌آمیزی شده افراد مبتلا به سالک در طی پنج سال ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۷ انجام گردید. حجم نمونه بر اساس تمام شماری محاسبه شد. لام‌های مد نظر در مراکز بهداشتی شهرستان‌های استان نگهداری می‌شدند. بیمارانی که از آنها نمونه گرفته شده است، از مناطق مختلف استان مراجعه نموده‌اند و مشخصات آنها ثبت شده است. ۵۲ لام مناسب از مراکز شهرستان‌های دهدشت(۳۰ نمونه)، یاسوج(۱۰ نمونه) و گچساران(۱۲ نمونه) تهیه و وارد مطالعه شد.

تمامی لام‌ها بر اساس پروتوکل استاندارد تهیه و با رنگ گیمسا رنگ‌آمیزی شده بودند.

لام‌های رنگ‌آمیزی شده، با استفاده از میکروسکوپ نوری و روغن ایمرسیون با درشت نمایی × ۱۰۰۰ مورد بررسی دقیق جهت یافتن اشکال آماستیگوت انگل(جسم لیشمن) قرار گرفتند. برای تأیید تشخیص از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز(PCR) استفاده شد. استخراج DNA به وسیله‌ی کیت شرکت یکتا تجهیز طبق پروتکل موجود در کیت صورت گرفت.

بعد از استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج کیاژن طبق دستورالعمل کیت، روش ملکولی PCR با هدف تکثیر ژن قطعه متغیر از حلقه‌های کوچک(minicircles) DNA کینتوپلاست انگل لیشمانیا با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *LINR4* و *LIN17* با توالی زیر انجام شد(جدول ۱).

محصول PCR بر روی ژل ران شد و سپس برای مشاهده باندهای مورد نظر داخل دستگاه Gel Duct قرار داده شد و باندهای مورد نظر قابل مشاهده گردید. با استفاده از این پرایمرها، باند 650bp مربوط به گونه *L.major* و باند 750bp مربوط به گونه *L.tropica* می‌باشد.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری مجذور کای تجزیه و تحلیل شدند.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده

نام پرایمر	توالی پرایمر
LINR4 (forward)	5’-GGG GTT GGT GTAAAA TAG GG-3
LIN17 (reverse)	5’-TTT GAA CGGGAT TTC TG-3’

یافته‌ها

از ۵۲ نمونه مورد مطالعه با روش میکروسکوپی، ۳٦ نمونه(٦۹/۲ درصد) حاوی جسم لیشمن گزارش شد که مثبت هستند. همگی این نمونه ها آنها به روش مولکولی(PCR) ارزیابی شدند و ٤۳ نمونه (۸۲/۷ درصد) مثبت گزارش شد. متغیرهای محل سکونت، جنس، گروه سنی و گونه غالب عامل لیشمانیوز جلدی در منطقه، با توجه به روش ذکر شده، با هم مقایسه شدند. میانگین سنی افراد مورد مطالعه ۲۳/۳۲ سال بود. بر اساس آزمون آماری مجذور کای نتایج در جدول ۲، به تفکیک متغیر ها نشان داده شده است.

از بین ۵۲ نمونه موجود در مطالعه ۲٦ نمونه (۵۰ درصد) مذکر و ۲٦ نمونه(۵۰ درصد) مؤنث هستند.

در روش مولکولی *PCR* تعداد ٤۳ نمونه از کل نمونه‌ها مثبت شد که شامل ۲۳ نمونه از افراد مذکر و ۲۰ نمونه از افراد مؤنث بود.

از بین ۵۲ نمونه موجود در مطالعه ۳۰ نمونه مربوط به دهدشت، ۱۲ نمونه مربوط به گچساران و ۱۰ نمونه نیز مربوط به یاسوج می باشد.

در روش مولکولی *PCR* در دهدشت از ۳۰ نمونه، ۲۵ نمونه مثبت شد. در گچساران از ۱۲ نمونه، ۱۱ نمونه مثبت و مابقی یک نمونه منفی شد. در یاسوج از ۱۰ نمونه، ۷ نمونه مثبت و مابقی ۳ نمونه منفی شد(جدول ۳).

در روش مولکولی *PCR*، ۳۲ نمونه از گونه *L.major*، ۱۰ نمونه از گونه *L.tropica* و ۱ نمونه *Mix* مشاهده شد و همچنین ۱۳ نمونه نیز منفی گزارش شد(جدول ٤)(شکل ۱).

جدول ۲: فراوانی نمونه‌های مثبت و منفی بر اساس سن(۵ گروه سنی) با روش مولکولی *PCR*

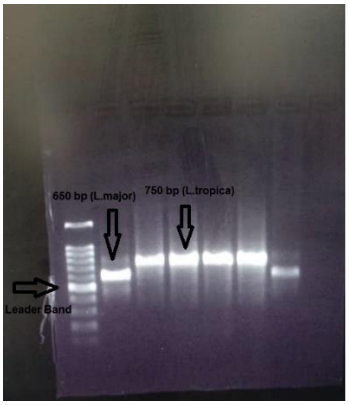
سن / متغیر	گروه سنی ۱ تعداد(درصد)	گروه سنی ۲ تعداد(درصد)	گروه سنی ۳ تعداد(درصد)	گروه سنی ٤ تعداد(درصد)	گروه سنی ۵ تعداد(درصد)	مجموع تعداد(درصد)
مثبت	(۳۱/۷)۱۳	(۱۲/۲)۵	(۲۲)۹	(۱٤/٦)٦	(۱۹/۵)۸	(۱۰۰)٤۱
منفی	(٤٤)٤	(۲۲/۲)۲	(۰)۰	(۱/۱)۱	(۲۲/۲)۲	(۱۰۰)۹

جدول ۳: فراوانی نمونه های مثبت و منفی بر اساس محل سکونت(دهدشت، یاسوج یا گچساران) با روش مولکولی PCR

محل سکونت / متغیر	دهدشت تعداد(درصد)	یاسوج تعداد(درصد)	گچساران تعداد(درصد)	مجموع تعداد(درصد)
مثبت	(۵۸/۱)۲۵	(۱٦/۳)۷	(۲۵/٦)۱۱	(۱۰۰)٤۳
منفی	(۵۵/٦)۵	(۳۳/۳)۳	(۱۱/۱)۱	(۱۰۰)۹

جدول ٤: فراوانی نمونه‌های مثبت و منفی بر اساس گونه عامل لیشمانیوز جلدی(ماژور، تروپیکا یا سایر گونه‌ها) با روش مولکولی PCR

گونه عامل لیشمانیوز جلدی / متغیر	*L.major* تعداد(درصد)	*L.tropica* تعداد(درصد)	*Mix* تعداد(درصد)	منفی تعداد(درصد)	مجموع تعداد(درصد)
مثبت	(۷٤/٤)۳۲	(۲۳/۳)۱۰	(۲/۳)۱	(۰)۰	(۱۰۰)٤۳
منفی	(۰)۰	(۰)۰	(۰)۰	(۱۰۰)۹	(۱۰۰)۹



عکس ۱: باندهای مربوط به گونه‌های *L.major* و *L.tropica* در *PCR* نمونه‌ها. باند *650bp* مربوط به گونه *L.major* و باند *750bp* مربوط به گونه *L.tropica* می باشد.

بحث

لیشمانیوز جلدی یک بیماری مزمن پوستی است که در اطراف شیراز به آن سالک، و در مشهد به آن لکه سال گفته می‌شود. این بیماری به ویژه در فصول گرم سال و در مناطق گرمسیر کشور، بیشترمشاهده می‌گردد. عامل این بیماری یک تک یاخته‌ای از جنس لیشمانیا و از خانواده *Trypanosomatidae* می‌باشد. سیر بیماری سالک به این صورت است که ابتدا به صورت یک برجستگی کوچک(پاپول) که بعد بزرگتر(ندول) می‌شود و به صورت زخم در می‌آید. زخم‌های این بیماری خود به خود ظرف چند هفته تا چند ماه و گاهی یک سال و یا بیشتر بهبود می‌یابند(۳ و۲). لذا هدف از این پژوهش، یک مطالعه گذشته نگر با روش مولکولی جهت تعیین گونه‌های مولد لیشمانیوز جلدی در استان کهگیلویه و بویراحمد بود.

در مقایسه نتایج مطالعه حاضر با مطالعه‌ای که به وسیله پورمحمدی و همکاران با موضوع "مقایسه سه روش تشخیص برای لیشمانیوز جلدی" انجام شد، در نهایت با استفاده از نتایج به دست آمده از PCR مشخص گردید که ۹۵/۶۱ درصد از نمونه مربوط به گونه *L.major*، ۳۹ درصد از نمونه‌ها مربوط به گونه *L.tropica* و *L.dermatropic* و ۰/۴۹ درصد نمونه نیز مربوط به گونه *L.infantum* می‌باشد. همچنین مشخص شد که روش PCR برای تشخیص گونه‌های عامل ایجاد لیشمانیوز جلدی در مقایسه با روش مشاهده مستقیم با میکروسکوپ نوری، روشی بهتر و حساس‌تر است و در همراهی با علایم پوستی ارزش بیشتری پیدا می کند(۸).

در مقایسه نتایج مطالعه حاضر با مطالعه‌ای که به وسیله محمدی و همکاران با موضوع "تشخیص و شناسایی گونه‌های لیشمانیا در مریض‌ها و جوندگان با کمک نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده با رنگ گیمسا به روش *PCR-RFLP* در منطقه دامغان، ایران" انجام شد، مشخص گردید تمام نمونه‌ها افراد این منطقه، مربوط به گونه *L.major* است. هم‌چنین نشان

داده شد که روش مولکولی *PCR-RFLP* روشی مؤثر و مفید جهت تشخیص گونه‌های لیشمانیا از نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده با رنگ گیمسا می‌باشد(۹).

در مقایسه نتایج حاضر با مطالعه‌ای که به وسیله صقفی‌پور و همکاران با موضوع "شناسایی گونه‌های لیشمانیا در مریض‌ها و جوندگان مخزن با استفاده از روش *PCR-RFLP* در قسمت‌های مرکزی استان قم در سال ۲۰۱۰" انجام شد، با استفاده از روش *PCR* و پرایمر اختصاصی *ITS1* مشخص گردید که تمامی ۱٦ نمونه از گونه *L.major* می‌باشد. هم‌چنین مشخص شد که روش *PCR-RFLP* روشی مؤثر مفید در ارزیابی گونه‌های تک یاخته لیشمانیا در لام‌های رنگ‌آمیزی شده با رنگ گیمسا در نمونه‌های انسانی و حیوانی می‌باشد(۱۰).

در مقایسه نتایج مطالعه حاضر با مطالعه‌ای که به وسیله خیراندیش و همکاران با موضوع "شناسایی گونه‌های تک یاخته لیشمانیا با استفاده از روش *PCR* بر روی لام‌های به دست آمده از افراد مبتلا به لیشمانیوز جلدی آغشته به رنگ گیمسا" بر روی ۱۷۸ نمونه انجام شد، مشخص گردید که ۱۲۹ نمونه با باند *485bp* مطابق با گونه *L.tropica*، ٤۹ نمونه دارای باند *626bp* مطابق با گونه *L.tropica* می‌باشد. هم‌چنین مشخص شد که هر دو گونه *L.major* و *L.tropica* در ساتان لرستان یافت می‌شود(۱۱).

در مقایسه نتایج مطالعه حاضر با مطالعه‌ای که به وسیله محمدی و همکاران با موضوع "شناسایی گونه‌های لیشمانیا عامل لیشمانیوز جلدی در استان خراسان، قسمت شمالی، با استفاده از روش *PCR-RFLP*)" بر روی ۹٤ نمونه انجام شد، مشخص گردید که ۳۳ مورد(۳۵ درصد) از نمونه متعلق به گونه *L.major* و ٦۱ مورد(٦۵ درصد) متعلق به گونه *L.tropica* می‌باشد. هم‌چنین نشان داده شد که گونه گونه غالب عامل لیشمانیوز جلدی در استان خراسان، به خصوص در شهرهای بزرگ و متوسط از قبیل؛ مشهد و شاندیز، *L.tropica* می‌باشد. در نهایت بیان گردید که روش *ITS-PCR-RFLP* روش مناسبی برای مشخص کردن گونه‌های مختلف می‌باشد(۱۲).

در مقایسه نتایج مطالعه حاضر با مطالعه‌ای که به وسیله فتاحی بافقی و همکاران با موضوع " جداسازی و شناسایی مولکولی گونه‌های انگل لیشمانیا در افراد میتبلا به لیشمانیوز جلدی در استان گلستان، ایران" بر روی ۳٦۰ نمونه انجام شد، با استفاده از روش PCR و پرایمرهای اختصاصی مربوطه مشخص گردید که ۱۸٦ نمونه لیشمانیوز جلدی روستایی، ٤ نمونه لیشمانیوز شهری و ۱۷۰ نمونه بدون آلودگی هستند. در نهایت این نتیجه حاصل شد که سابقه سفر فرد مشکوک به آلودگی لیشمنیوز جلدی فاکتور مهمی در تشخیص بیماری است و تأیید انگل‌شناسی آلودگی برای شروع درمان ضروری می باشد(۱۵).

در همراهمی نتایج مطالعه حاضر با مطالعه‌ای تحت عنوان " شناسایی گونه‌های عامل لیشمانیوز جلدی به روش *PCR* در استان‌های صلاح‌الدین و بغداد عراق" انجام شد، ۱۱۷ نمون در این استان تهیه و مورد بررسی قرار گرفتند. بیشترین عامل آلودگی *L.tropica* و *L.major* و کمترین عامل نیز *L.aethiopica* بود. در نهایت این نتیجه حاصل شد که آقایان بیشتر از خانم‌ها در معرض آلودگی قرار دارند. هم‌چنین

مشخص گردید که *PCR* مؤثرترین و حساس‌ترین روش برای شناسایی گونه‌های لیشمانیوز جلدی می‌باشد(١٦).

این مطالعه چون یک مطالعه گذشته نگر بود، با توجه به گذشتن زمان زیادی از گرفتن لام‌ها کیفیت لازم برای جداسازی DNAی انگل را نداشتند، لذا بهتر است مطالعه بر روی نمونه‌های تازه انجام گیرد، بنابراین انجام پژوهش‌های بیشتر به منظور شناسایی ناقلین و مخازن میزبان‌های انگل عامل لیشمانیوز جلدی در استان کهگیلویه و بویراحمد پیشنهاد می‌گردد. همچنین با توجه به تفاوت فاحش دو روش در تشخیص نمونه‌های مثبت، مشخص گردید که *PCR* با کمک پرایمرهای اختصاصی، روشی مناسب و حساس جهت تشخیص و افتراق گونه‌های عامل لیشمانیوز جلدی می باشد.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج این مطالعه مشخص گردید که هر دو گونه *L.major* و *L.tropica* در استان کهگیلویه و بویراحمد، عامل لیشمانیوز جلدی می‌باشند. گونه *L.major* در دهدشت و یاسوج و گونه *L.tropica* در گچساران یافت شد. همچنین میزان نمونه‌های مثبت با روش میکروسکوپی ٣٦ نمونه(٦٩/٢ درصد) و با روشPCR(٨٢/٧ درصد) می‌باشد.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان نامه دانشجویی دوره پزشکی عمومی با کد اخلاق IR.YUMS.REC.1398.008 دانشگاه علوم پزشکی یاسوج می‌باشد که با حمایت مالی این دانشگاه انجام شده است.

REFERENCES

1.Nadim A, Javadian A, Mohebali M, Zamani, M. Leishmania parasite and leishmaniasis. Tehran: University Publishing Center; 2008; 20-32.
2.Dedet JP, Pratlong F, Cook GC, Zumla A. Manson's tropical diseases. London: Leishmaniasis; 2003; 1339-64.
3.Jarrahi M, Zahedi M, Taherian A, Miladi H, Safakhah H. Evaluation of topical *matricaria chamomilla* L. Oil extract activity on linear incisional wound healing in albino rats. J Med Plants 2009; 8(29): 94-9.
4.Parvizi P, Moradi Q, Amirkhani A. Comparison of molecular methods with other common laboratory methods in tracing leishmania in animal reservoirs of rural cutaneous leishmaniasis. Iranian Journal Of Infectious Diseases and Tropical Medicine 2009; 14(44): 13-9.
5.Aransay AM, Scoulica E, Tselentis Y. Detection and identification of Leishmania DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. Applied and Environmental Microbiology 2000; 66(5): 1933-8.
6.Faiman R, Abbasi I, Jaffe C, Motro Y, Nasereddin A, Schnur LF, et al. A newly emerged cutaneous leishmaniasis focus in northern Israel and two new reservoir hosts of Leishmania major. PLoS Neglected Tropical Diseases 2013; 7(2): e2058.
7.World Health Organization. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, Switzerland, 22-26 March 2010. WHO Technical Report Series 2010(949).
8.Pagheh AS, Fakhar M, Mesgarian F, Gholami S, Badiee F. Detection and Identification of Causative Agent of Cutaneous Leishmaniasis Using Specific PCR. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences 2012; 21(1): 85-92.
9.David T. John: Markle parasitology. Translated by Parviz Kvakab. Tehran: Andisheh Rafi Publications; 2011.
10.Pourmohammadi B, Motazedian MH, Hatam GR, Kalantari M, Habibi P, Sarkari B. Comparison of three methods for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. Iranian Journal of Parasitology 2010; 5: 1-8.
12.Mohammadi AS, Rasi Y, Oshaghi MA, Yaghoubi EM, Mohebali M, Abaei Mr, et al. Diagnosis and characterization of leishmania species in patients and rodents Giemsa-stained slides by PCR-RFLP in Damghan district, Iran.
14.Kheirandish F, Sharafi AC, Kazemi B, Mohebali M, Sarlak A, Tarahi MJ, Holakouee K, Hajaran H. Identification of Leishmania species using PCR assay on giemsa-stained slides prepared from cutaneous leishmaniasis patients. Iranian Journal of Parasitology 2013; 8(3): 382.
15.Mohammadiha A, Dalimi A, Mahmoodi MR, Parian M, Pirestani M, Mohebali M. The PCR-RFLP-based detection and identification of the Leishmania species causing human cutaneous leishmaniasis in the Khorasan-Razavi Province, Northeast of Iran. Journal of Arthropod-Borne Diseases 2017; 11(3): 383.
16.Bafghi F, Eslami G, Niazjorjani O, Mirzaei F, Namrodi J. Isolation and Molecular Identification of Leishmania spp. in Patients With Cutaneous Leishmaniasis in Golestan Province, Iran. International Journal of Epidemiologic Research 2019; 6(1): 8-13.
17.Al-Jubori MI, Abd Alrahman A, Al-Faham MA. Detection of Cutaneouse Leishmaniasis species via PCR in Salah Adeen and Baghdad provences. Tikrit Journal of Pure Science. 2019; 24(1): 57-61.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Identification of Cutaneous *Leishmaniasis-causing* Species Using Semi-Nested PCR in Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad Province During 2013-2019

Arefkhah N, Shafiei S, Saadat nia A, Moshfe A*

Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran.

Received: 08 May 2022 Accepted: 26 Jul 2022

Abstract

Background & aim: Cutaneous leishmaniasis or leishmaniasis in Iran is caused by two species of Leishmania parasites including: *L. major* and *L. tropica*. In recent years, the disease has been reported in different parts of Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad Province. Due to the huge differences in the type of animal reservoirs and biological carriers, identifying the causative agent can be effective in the necessary planning to control the disease. Therefore, the aim of the present study was to determine the causative species of cutaneous leishmaniasis in Kohgiluyeh and Boyer Ahmad province, Iran, by molecular methods: a retrospective study.

Methods: The present cross-sectional and retrospective descriptive study was conducted to determine the species of Leishmania, 52 samples of smears stained with Giemsa dye were collected from different laboratories in the cities of the province between 2013 and 2017 and were examined using light microscope for the presence of Leishman's body. After extracting the DNA present on the surface of slides, using specific primers LINR4 and LIN17, the species of Leishmania parasite was identified by PCR method. The data were analyzed using chi-score statistical test.

Results: Out of 52 samples with cutaneous leishmaniasis lesions, 26 (50%) were male and 26 (50%) were female. The mean age of the participants in the study was 23.32 years (with a standard deviation of ±18.42). Out of 52 samples, parasitic amastigotes (Leishman's body) were observed in 36 cases (69.2%) by direct observation using a light microscope and 43 samples (82.7%) were positive for PCR. Infectious species in all residents of Dehdasht and Yasuj were *L. major* and *L. tropica* in Gachsaran.

Conclusion: the results of the present study indicated that *L.major* and *L.tropica* species were the cause of cutaneous leishmaniasis in Dehdasht, Yasuj, and Gachsaran. Therefore, further studies are suggested to identify vectors and reservoirs of cutaneous leishmaniasis parasites in Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad province, Iran.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis, Species, *L.tropica*, *L.major*, Iran.

Corresponding author: Moshfe A, Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran.
Email:amoshfea@yahoo.com

Please cite this article as follows: Arefkhah N, Shafiei S, Saadat nia A, Moshfe A. Identification of Cutaneous *Leishmaniasis-causing* Species Using Semi-Nested PCR in Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad Province During 2013-2019. Armaghane-danesh 2022; 27(4): 497-506.