

بررسی اپیدمیولوژی و شناسایی مولکولی لیشمانیوز جلدی در شهرستان مرودشت استان فارس

الهام اسفندیاری^۱، الهام معظیان^{۲*}، هادی عبدالعظیمی^۳

تاریخ دریافت: ۹۸/۱/۹

تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۲/۹

تاریخ چاپ: ۹۹/۱/۲۰

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: لیشمانیوز یکی از بیماری‌های مشترک بین انسان و دام است؛ که توسط گونه‌های مختلف تک یاخته‌ای از جنس لیشمانیا ایجاد می‌شود. هدف از این مطالعه تشخیص مولکولی گونه‌های لیشمانیای جلدی در شهرستان مرودشت بود.

شیوه مطالعه: این مطالعه مقطعی توصیفی، بر روی ۳۳۳ بیمار مشکوک به لیشمانیوز پوستی مراجعه‌کننده به شبکه بهداشت شهرستان مرودشت صورت گرفت. پس از تهیه گسترش از ضایعه بیمار و رنگ‌آمیزی گیمسا، آماستیکوت‌های انگل با استفاده از میکروسکوپ نوری مشاهده شدند. شناسایی مولکولی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی LIN4 و LIN17 انجام گرفت.

یافته‌ها: از ۱۳۳ گسترش استخراج شده، آلودگی به انگل لیشمانیا با استفاده از روش میکروسکوپی و مولکولی در ۱۰۳ نمونه تأیید شد. نتایج PCR نشان داد که عامل سالک در نمونه‌های مورد مطالعه لیشمانیا ماژور می‌باشد. با بررسی اطلاعات دموگرافیک بیماران مشخص شد که رخداد بیماری در مردان (۵۰/۴٪)، فصل تابستان (۶۰/۳٪)، شهریورماه (۲۹/۳٪)، گروه سنی ۴۴/۵۰-۲۶/۲۷ (۲۷/۱٪)، زنان خانه‌دار (۲۴/۸٪) و روستانشین (۵۳/۴٪) بیشتر از سایر گروه‌ها بود؛ و دست‌ها (۳۸/۳٪) بیشترین عضو مبتلا بودند. (۵۰٪) بیماران دارای یک ضایعه در اندام‌های خود بودند. در بین افراد مورد بررسی به ترتیب (۱۸٪)، (۱/۵٪) و (۱۹/۵۴٪) سابقه مسافرت، سالک و مصرف دارو را داشتند. همچنین ماه بروز بیماری و محل ضایعه با شدت زخم ارتباط نشان دادند.

نتیجه‌گیری: نمونه‌های لیشمانیوز پوستی به‌دست‌آمده در شهرستان مرودشت به طور عمده از نوع لیشمانیوز روستایی بود. بنابراین جهت کنترل و پیشگیری از این بیماری مبارزه با جوندگان به عنوان یکی از مهم‌ترین استراتژی‌های کنترلی باید در اولویت قرار گیرد.

کلمات کلیدی: لیشمانیوز جلدی، مرودشت، لیشمانیا ماژور، عفونت انسانی

ارجاع: اسفندیاری الهام، معظیان الهام، عبدالعظیمی هادی. بررسی اپیدمیولوژی و شناسایی مولکولی لیشمانیوز جلدی در شهرستان مرودشت استان فارس. مجله مطالعات بالینی دانشکده پزشکی افضلی پور ۱۳۹۹؛ ۲(۱-۲): ۲۱-۳۲

۱. کارشناسی ارشد، گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم کشاورزی و فناوری های نوین، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

۲. استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم کشاورزی و فناوری های نوین، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

۳. استادیار، گروه کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی و فناوری های نوین، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

مقدمه

لیشمانیوزیس (Leishmaniasis) به بیماری اطلاق می‌شود که توسط انگلی از جنس لیشمانیا (خانواده تریپانوزوماتیده (Trypanosomatidae)) ایجاد می‌گردد و در مناطق گرمسیری، نیمه گرمسیری، حوزه مدیترانه به صورت اندمیک وجود دارد و در بیش از ۹۸ کشور مشاهده شده است. در مجموع ۳۵۰ میلیون نفر در معرض خطر و ۱۲ میلیون مبتلا در این مناطق وجود دارد. لیشمانیوز سگ‌سانان یک مشکل جدی است و تخمین زده می‌شود که ۲/۵ میلیون سگ تنها در منطقه حوزه دریای مدیترانه آلوده باشند (۱).

عفونت‌های لیشمانیا بر اساس موقعیت انگل در بافت آلوده دارای ۶ فرم کلینیکی می‌باشند: لیشمانیوز احشایی (VL)، لیشمانیوز پوستی بعد از کالاآزار (PKDL)، لیشمانیوز جلدی (CL)، لیشمانیوز جلدی منتشره (DCL)، لیشمانیوز جلدی مخاطی (MCL)، لیشمانیوز مخاطی (ML). شایع‌ترین فرم این بیماری لیشمانیوز پوستی می‌باشد که بیش از ۹۰ درصد موارد در مناطق افغانستان، ایران، عربستان سعودی، سوریه، الجزایر و تونس، برزیل و پرو توزیع شده است. بیش از ۹۰ درصد از موارد لیشمانیوز احشایی که نسبت به فرم پوستی کمتر رایج اما بیماری‌زاتر است در سه مرکز جغرافیایی دیگر شامل بنگلادش، هند و نپال - اتیوپی، کنیا و سودان - شمال شرقی برزیل گسترده می‌باشد (۲). فاکتورهایی تأثیرگذار بر وقوع بیماری شامل گونه انگل لیشمانیا، میزبان (حساسیت ژنتیکی، ضعیف بودن سیستم ایمنی، تغذیه نامناسب و سایر بیماری‌های زمینهای) و محیط زیست می‌باشد (۳).

لیشمانیوز پوستی به عنوان یکی از مشکلات عمده بهداشتی در بسیاری از کشورهای جهان از جمله ایران مطرح است. سالانه ۱ تا ۱/۵ میلیون مورد جدید مبتلا به لیشمانیوز جلدی گزارش می‌گردد (۴). ایران جزء مناطق آندمیک این بیماری محسوب می‌شود و گرچه سالانه حدود ۲۰۰۰۰ مورد بیماری سالک در ایران گزارش می‌شود ولی احتمالاً تعداد واقعی موارد بیش از ۴ تا ۵ برابر این عدد است؛ سازمان جهانی بهداشت در سال ۲۰۱۲ موارد ابتلا به سالک در ایران را بین ۶۹۰۰۰ تا ۱۱۳۰۰۰ مورد در سال برآورد کرد (۲). لیشمانیوز یکی از هفت بیماری مهم مناطق گرمسیری و یک مشکل جدی برای سلامت جهانی محسوب می‌شود؛ که طیف وسیعی از

تظاهرات بالینی را ارائه می‌دهد و می‌تواند به مرگ منجر شود (۵).

عوامل بیماری لیشمانیوز، گونه‌های انگل لیشمانیا، ناقلین بیماری، انواع پشه خاکی و مخازن بیماری سگ‌سانان و جوندگان می‌باشند. سه گونه از انگل لیشمانیا به عنوان عامل بیماری لیشمانیوز انسانی در ایران شناخته شده‌اند؛ که از نظر اهمیت اپیدمیولوژیکی به ترتیب شامل لیشمانیا ماژور (*L. major*)، لیشمانیا تروپیکا (*L. tropica*) و لیشمانیا اینفانتوم (*L. infantum*) می‌باشند (۶).

لیشمانیوز در همه قاره‌ها به جز اقیانوسیه یافت می‌شود و در مناطق جغرافیایی مختلفی از جمله شمال شرقی آفریقا، جنوب اروپا، خاورمیانه، جنوب شرقی مکزیک و آمریکای مرکزی و جنوبی به صورت اندمیک وجود دارد (۷). در حال حاضر ۵۴ گونه لیشمانیا (به جز مواردی که بر اساس نتایج شناسایی مولکولی مشابه در نظر گرفته شده‌اند)، شناخته شده است و حداقل ۲۱ گونه از آن‌ها برای انسان بیماری‌زا می‌باشد (۸).

به دلیل گستردگی مخازن غیرانسانی و همچنین وجود تعداد زیاد حامل برای انتقال، تشخیص بهتر انگل لیشمانیا یکی از برنامه‌های پراهمیت کنترلی آینده محسوب می‌گردد (۹). مطالعه در مورد اپیدمیولوژی، روند بیماری‌زایی، روش‌های درمانی، روش‌های تشخیصی گونه‌های لیشمانیا و اصولاً تعیین گونه و حتی سویه لیشمانیا جهت انجام مطالعات و کمک به تأمین سلامت عمومی امری لازم و ضروری محسوب می‌شود؛ بنابراین این پژوهش باهدف تشخیص مولکولی گونه‌های لیشمانیای جلدی (لیشمانیا ماژور و لیشمانیا تروپیکا) در بیماری سالک در شهرستان مرودشت انجام شد.

شیوه مطالعه

این مطالعه مقطعی-توصیفی می‌باشد و به مدت یک‌سال از فروردین ۱۳۹۷ با کد اخلاق اخذ شده از دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز (۱۶۳۳۰۵۰۷۹۶۲۰۲۲) به شرح زیر انجام شد.

جمع‌آوری نمونه

جهت جمع‌آوری نمونه از مراجعه‌کنندگان به مرکز بهداشت شهرستان مرودشت و دارای زخم‌های مشکوک به لیشمانیوز در نواحی مختلف بدن شامل دست، پا، صورت، کمر و ... در

فاصله زمانی فروردین ۱۳۹۷ تا فروردین ۱۳۹۸ تعداد ۳۳۳ نمونه جمع‌آوری گردید. اطلاعات دموگرافیک بیماران شامل: سن، جنس، محل زندگی، تاریخ بروز بیماری، تعداد ضایعه، محل ضایعه، سابقه مسافرت، سابقه سالک، مصرف دارو و غیره توسط پرسشنامه و به همراه فرم رضایت نامه از بیماران دریافت شد.

نمونه‌برداری از ضایعات

جهت نمونه‌برداری از ضایعات بیماران، ابتدا اطراف موضع توسط پنبه یا گاز استریل با الکل ۷۰ درصد در جهت عقربه‌های ساعت تمیز گردید. چنانچه زخم‌ها آلوده به عفونت قارچی بودند، قسمت مورد نظر برای نمونه‌برداری از ضایعات عفونی پاک شد. با استفاده از لنست یکبار مصرف استریل، از لبه و حاشیه زخم در جهت مرکز به حاشیه شکافی ایجاد گردید، سپس مقداری از سرروزیته توسط لنست به سطح لام منتقل و به خوبی پخش شد. نمونه‌برداری به نحوی انجام شد که کمترین خون وارد نمونه‌ها گردد. نام و شماره بیمار در کنار لام نوشته شد.

رنگ‌آمیزی گسترش‌ها و بررسی‌های میکروسکوپی

تشخیص بیماری با تهیه اسمیر مستقیم از ضایعات پوستی؛ و فیکس کردن آن‌ها با متانول ۹۵ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و سپس با رنگ گیمسا (رقت ۱:۱۰ با آب مقطر) به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه انجام شد. پس از رنگ‌آمیزی لام‌ها با آب شسته و بعد از خشک شدن لام‌های تهیه شده، از نظر وجود آماستیگوت‌ها (اجسام لیشمن (و با پاور ۱۰۰ میکروسکوپ نوری با روغن ایمرسیون مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه حاضر مشاهده اشکال آمستیگوت انگل در گسترش‌ها به منزله مثبت بودن آلودگی و عدم مشاهده آن در زیر میکروسکوپ به منزله منفی بودن تلقی گردید.

شناسایی مولکولی

به منظور شناسایی مولکولی، ابتدا استخراج DNA از لام، با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت Favorgen) طبق دستور شرکت سازنده انجام گرفت. سنجش غلظت و خلوص DNA استخراج شده با دستگاه نانودراپ در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز بر روی ژن ITS انگل لیشمانیا انجام گردید. پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش قادر به تشخیص

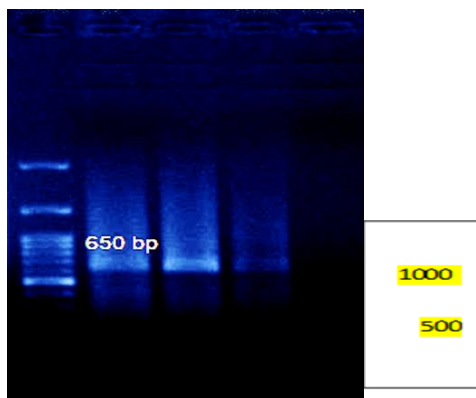
تجزیه و تحلیل اطلاعات

کلیه داده‌های به‌دست‌آمده از شناسایی انگل توسط آزمون PCR و همچنین برای تحلیل داده‌های گردآوری شده از آمار توصیفی (فراوانی و درصد فراوانی نسبی) به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ استفاده شد (۱۰-۱۲)؛ و سطح معناداری $\leq 0/001$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

پس از نمونه‌برداری از ضایعات و زخم‌های مشکوک، بررسی‌های میکروسکوپی بر روی ضایعات انجام شد و در

در پژوهش حاضر از بین ۱۳۳ نمونه که به روش میکروسکوپی مثبت تشخیص داده شد، پس از استخراج DNA، جهت شناسایی مولکولی ارزیابی گردید. ۱۰۳ نمونه بر اساس آزمایش‌های مولکولی مثبت تأیید شدند. همچنین عامل سالک در طی این پژوهش در تمام نمونه‌های جمع‌آوری شده از شبکه بهداشت شهرستان مرودشت گونه لیشمانیا ماژور (۱۰۰٪) تشخیص داده شد (شکل ۲).



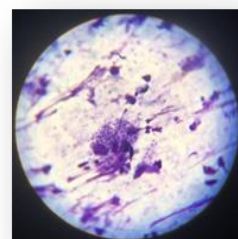
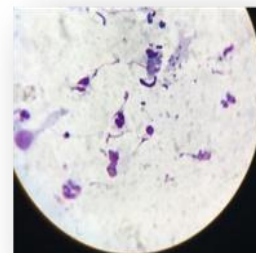
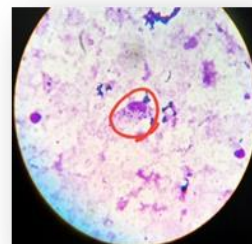
شکل ۲. نتایج PCR نمونه‌های جدا شده از بیماران شهرستان مرودشت. چاهک ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی سینا ژن، چاهک ۲ و ۳: لیشمانیا ماژورهای شناسایی شده در لام بیماران، چاهک ۴: کنترل مثبت (لیشمانیا ماژور) و چاهک ۵: کنترل منفی.

نتایج حاصل از بررسی اطلاعات دموگرافیک بیماران اطلاعات دموگرافیک بیماران در طی پژوهش ثبت گردید (جدول ۱)، اما ۱۰۰ درصد نمونه‌ها گونه لیشمانیا ماژور بودند و هیچ موردی لیشمانیا تروپیکا تشخیص داده نشد، بنابراین ارتباطی بین گونه انگل و تعداد ضایعه، محل ضایعه، جنس، سن افراد و... از لحاظ آماری وجود نداشت؛ در نتیجه اطلاعات دموگرافیک از سایر زوایای آماری مورد بررسی قرار گرفتند.

جدول ۱. توزیع سنی بیماران با تشخیص لیشمانیوز جلدی مرطوب به

| تفکیک جنس در شهرستان مرودشت | | |
|-----------------------------|----------|----------|
| جنسیت | مرد (۶۷) | زن (۶۶) |
| گروه سنی | تعداد | تعداد |
| | (درصد) | (درصد) |
| ≤ ۱۰ | (۲۳/۹)۱۶ | (۱۶/۷)۱۱ |

نهایت از مجموع ۳۳۳ نمونه مشکوک، ۱۳۳ مورد جهت شناسایی مولکولی مورد بررسی قرار گرفت. تعیین فراوانی انگل لیشمانیا به روش میکروسکوپی در این مطالعه پس از نمونه‌برداری از ضایعات و زخم‌های مشکوک به لیشمانیوز؛ و تهیه اسمیر از ضایعات و جستجوی آمستیکوت‌های انگل روی لام در زیر میکروسکوپ نوری، از مجموع ۳۳۳ نمونه مشکوک جمع‌آوری شده، در ۱۳۳ نمونه اجسام لیژمن داخل و خارج از ماکروفاژها تشخیص داده شد (شکل ۱).



شکل ۱. اجسام لیژمن در نمونه حاصل از زخم و ضایعه جلدی در زیر میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۱۰۰x

نتایج حاصل از شناسایی مولکولی انگل

جدول ۱. ادامه

| | | |
|-------------|----------|----------|
| ۲۷/۲۵-۱۱ | ۱۴(۲۰/۹) | ۱۶(۲۴/۲) |
| ۲۶/۲۶-۴۴/۵۰ | ۱۸(۲۶/۹) | ۱۸(۲۷/۳) |
| ۴۴/۵۱-۶۶/۷۵ | ۱۸(۲۶/۹) | ۱۴(۲۱/۲) |
| <۶۱/۷۵ | ۱(۱/۵) | ۷(۱۰/۶) |

از ۱۳۳ مورد مثبت، ۶۷ نفر مرد (۵۰/۴٪) و ۶۶ نفر زن (۴۹/۶٪) بودند. افراد مورد مطالعه در فاصله سنی ۱-۷۹ سال قرار داشتند. در مطالعه حاضر میانگین سنی مبتلایان ۳۳/۲۰±۳۱/۶۲ سال بود. گروه سنی ۴۴/۵۰-۲۷/۲۶ سال با ۳۶ مورد (۲۷/۱٪) بیشترین و گروه سنی بالای ۶۱/۷۶ سال با ۸ مورد (۶٪) کمترین تعداد بیماری را داشتند (جدول ۱). ضایعات ناشی از سالک در طی این پژوهش در دست، پا، صورت، تنه و همچنین به صورت مشترک در اندامهای مذکور (دست و پا، دست و صورت، دست و تنه و...) دیده شد. بیشترین ضایعات در دست (۳۸/۳٪) و کمترین میزان ضایعات (۳/۸٪) در تنه حاصل گردید.

در بین جمعیت مورد بررسی تعداد ضایعات بر روی اندامها بین ۱ تا ۱۰ عدد متغیر بود، میانگین تعداد زخمها نیز ۸۱/۲±۲/۱ بود. بیشترین فراوانی مربوط به افرادی بود که تعداد ۱ ضایعه، ۵۱ مورد (۳۸/۳٪) را در اندامهای خود داشتند و همچنین کمترین فراوانی مربوط به گروهی بود که ۳ زخم، ۱۸ مورد (۱۳/۵٪) را بر روی بدن خود داشتند. از بین ۱۳۳ فرد درگیر تعداد ۶۲ مورد (۴۶/۶٪) ساکن شهر و ۷۱ مورد (۵۳/۴٪) ساکن روستا بودند، بنابراین بیشترین درگیری در افراد روستانشین دیده شد. شغل افراد مورد تحقیق نیز بررسی شد و توزیع فراوانی سالک در پنج گروه خانه‌دار، کودک، محصل، راننده، سایر مشاغل (کارمند، کارگر، کشاورز، پرستار، آزاد) بررسی گردید. بیشترین درگیری در سایر مشاغل (۳۸/۳٪) مشاهده شد؛ اما با توجه به این که این گروه خود مجموعه‌ای از چند شغل می‌باشد بنابراین می‌توان گفت که افراد خانه‌دار (۲۴/۸٪) و کودکان (۱۷/۳٪) بیشترین میزان درگیری به سالک را در این مطالعه داشتند.

با بررسی نتایج مشخص شد که بیشترین درصد فراوانی سالک مربوط به ماه‌های شهریور ۳۹ (۲۹/۳٪)، مهر ۳۱

(۲۳/۳٪) و آبان ۲۸ (۲۱/۱٪) بود. داده‌ها بیشترین بروز بیماری را در فصل تابستان و پاییز نشان دادند؛ و در فصل بهار میزان ابتلا به مراتب پایین‌تر از دو فصل مذکور بود. در ماه‌های اردیبهشت، آذر و دی ماه هیچ موردی یافت نشد. توزیع فراوانی مربوط به تاریخ مراجعه بیماران به آزمایشگاه، برحسب ماه‌های مختلف نشان داد که بیشترین درصد مراجعه مربوط به ماه‌های آبان (۳۳/۱٪) و مهر (۳۱/۶٪) بود؛ و در ماه‌های فروردین، اردیبهشت، مرداد هیچ مراجعه‌ای صورت نگرفته بود. از نظر سابقه مسافرت ۸۲ درصد از مبتلایان به جایی سفر نکرده بودند، در حالی که ۱۸ درصد از افراد درگیر سابقه سفر به مناطقی مانند گرم‌آباد، معصوم‌آباد، فیروزی، دولت‌آباد، کرمان، رامجرد و کوشک را داشتند. افراد مورد بررسی از نظر اینکه آیا در طی مدت درگیری با سالک دارویی مصرف کرده‌اند تحت پرسش قرار گرفتند؛ که حدود ۲۶ نفر (۱۹/۵۴٪) سابقه مصرف برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها را در طی این مدت داشتند؛ و تقریباً ۸۰/۴۵ درصد افراد دیگر هیچ‌گونه دارویی در طی این زمان مصرف نکرده بودند.

از بین افراد مورد بررسی تنها ۲ مورد (۱/۵٪) سابقه ابتلا به سالک را داشتند و برای بقیه افراد (۹۸/۵٪) هیچ‌گونه سابقه‌ای در این خصوص ذکر نگردید. در بین افراد تحت بررسی تنها ۵ مورد (۳/۷۵٪) دارای حیوان خانگی بودند؛ و از بین این موارد، تنها ۱ مورد وجود زخم در حیوان خانگی گزارش شد. ارتباط متغیرها با تعداد زخم در جدول ۲ مورد بررسی قرار گرفت. در پایان نتایج نشان داد که بین تعداد زخم و محل ضایعات ایجاد شده در سطح (۰/۰۵) ارتباط معناداری وجود داشت؛ به طوری که بیشترین تعداد ضایعات ایجاد شده در دست بود و این می‌تواند به دلیل در معرض بودن و بدون پوشش بودن این عضو باشد (P=۰/۰۰)؛ همچنین بین تعداد ضایعات و ماه بروز بیماری از لحاظ آماری ارتباط معناداری وجود داشت، به طوری که بیشترین تعداد موارد بیماری سالک در شهریورماه رخ داده است (P=۰/۰۳۵). در سایر موارد بین تعداد زخمها و دیگر متغیرها از لحاظ آماری ارتباط معناداری وجود ندارد (P<۰/۰۵).

جدول ۲. ارزیابی ارتباط بین متغیر های تحت بررسی و تعداد زخم ناشی از سالک

| متغیر | ازخیم (n=51) | ازخیم (n=25) | ازخیم (n=18) | ازخیم و بیشتر (n=39) | سطح معناداری |
|---------------------------|--------------|--------------|--------------|----------------------|--------------|
| محل ضایعه | دست | (.51)26 | (.44)11 | (.27)5 | (.23/1)9 |
| | پا | (.23/5)12 | (.16)4 | (.27/8)5 | (.7/7)3 |
| | صورت | (.23/5)12 | (.20)5 | (.5/6)1 | (.5/1)2 |
| | تنه | (.2)1 | (.4)1 | (.11/1)2 | (.2/6)1 |
| جنسیت | چند اندام | 0 | (.16)4 | (.27)5 | (.6/1)24 |
| | زن | (.45/1)23 | (.52)13 | (.50)9 | (.53/8)21 |
| تاریخ بروز بیماری | مرد | (.54/9)28 | (.48)12 | (.50)9 | (.46/2)18 |
| | فروردین | (.2)1 | 0 | 0 | 0 |
| تاریخ مراجعه به آزمایشگاه | خرداد | (.3/9)2 | (.4)1 | 0 | (.7/7)3 |
| | تیر | (.7/8)4 | (.4)1 | 0 | (.5/1)2 |
| | مرداد | (.9/8)5 | (.24)6 | (.11/1)2 | (.20/5)8 |
| | شهریور | (.2/6)11 | (.20)5 | (.55/6)10 | (.33/3)13 |
| تاریخ مراجعه به آزمایشگاه | مهر | (.17/6)9 | (.36)9 | (.11/1)2 | (.28/2)11 |
| | آبان | (.37/3)19 | (.12)3 | (.22/2)4 | (.5/1)2 |
| | خرداد | (.3/9)2 | 0 | 0 | 0 |
| | تیر | (.3/9)2 | (.4)1 | 0 | 0 |
| مسافرت | شهریور | (.13/7)7 | (.16)4 | (.16/7)3 | (.23/1)9 |
| | مهر | (.21/6)11 | (.32)8 | (.33/3)6 | (.43/3)17 |
| | آبان | (.35/3)18 | (.44)11 | (.44/4)8 | (.17/9)7 |
| | آذر | (.21/6)11 | (.4)1 | (.5/6)1 | (.15/4)6 |
| سکونت | خیر | (.78/4)40 | (.92)23 | (.83/3)15 | (.79/5)31 |
| | بله | (.21/6)11 | (.8)2 | (.16/7)3 | (.20/5)8 |
| گروه سنی | شهر | (.49)25 | (.44)11 | (.50)9 | (.43/6)17 |
| | روستا | (.51)26 | (.56)14 | (.50)9 | (.56/4)22 |
| | ≤10 | (.21/6)11 | (.28)7 | (.33/3)6 | (.7/7)3 |
| | -11 | (.23/5)12 | (.16)4 | (.22/2)4 | (.25/6)10 |
| شغل | 27/25 | | | | |
| | -2/26 | (.29/4)15 | (.20)5 | (.16/7)3 | (.33/3)13 |
| | 44/5 | | | | |
| | -44/51 | (.19/6)10 | (.32)8 | (.16/7)3 | (.28/2)11 |
| شغل | 61/75 | | | | |
| | 61/76≤ | (.5/9)3 | (.4)1 | (.11/1)2 | (.5/1)2 |
| | خانه دار | (.21/6)11 | (.20)5 | (.33/3)6 | (.28/2)11 |
| | بیکار | (.19/6)10 | (.20)5 | (.27/8)5 | (.7/7)3 |
| شغل | راننده | (.7/8)4 | 0 | (.11/1)2 | (.5/1)2 |
| | محصل | (.11/8)6 | (.16)4 | (.11/1)2 | (.15/4)6 |
| | سایر | (.39/2)20 | (.44)11 | (.16/7)3 | (.43/6)17 |

بحث و نتیجه گیری

بیماری لیشمانیوز، به علت درگیری و اختلال در سیستم‌های بهداشتی در مناطق آندمیک، مهاجرت و تغییرات محیطی مانند شهرسازی بی‌رویه و جنگل‌زدایی که روابط زیست محیطی انسان‌ها، ناقلین و مخازن را تحت تأثیر قرار می‌دهد، رو به افزایش می‌باشد (۱۳، ۱۴).

درمان مؤثر سالک بستگی به شناخت گونه لیشمانیای عامل بیماری دارد. از سوی دیگر بر اساس پروتکل کشوری درمان سالک و همچنین سازمان بهداشت جهانی، تمام موارد ابتلا به سالک نوع روستایی با عامل لیشمانیا ماژور، در صورت وجود زخم در نقاط پوشیده بدن نیاز به درمان ندارند؛ زیرا باعث مصونیت شخص خواهد شد (۱۵، ۱۶). سازمان بهداشت جهانی انجام طرح‌های تحقیقاتی بنیادین در مورد اپیدمیولوژی لیشمانیوز را توصیه کرده است (۱۷).

در ابتدا جهت شناسایی گونه‌های لیشمانیا فقط از ویژگی‌های خارجی مانند تظاهرات بالینی، توزیع جغرافیایی، چرخه اپیدمیولوژیک و نحوه رفتار لیشمانیا در پشه خاکی استفاده شد. از دهه ۱۹۸۰، تکثیر DNA با استفاده از PCR، تشخیص سریع و بسیار حساس لیشمانیا را همراه با شناسایی مولکولی در نمونه‌های بیولوژیکی امکان‌پذیر کرد (۱۸). به دلیل اینکه حساسیت روش‌های مولکولی در تعیین آلودگی لیشمانیایی در نمونه‌های بالینی بیشتر از روش‌های میکروسکوپی است، تعداد زیادی از محققان استفاده از روش‌های مولکولی را به عنوان استاندارد طلایی برای تشخیص این بیماری معرفی کرده‌اند (۱۹).

استان فارس به عنوان یکی از مهم‌ترین کانون‌های لیشمانیوز؛ و تنها کانون بیماری که در آن هر دو نوع بیماری لیشمانیوز پوستی به دو شکل شهری و روستایی؛ و لیشمانیوز احشایی به صورت آندمیک وجود دارد. بر اساس آمار وزارت بهداشت، ۲۳ درصد بروز سالانه بیماری لیشمانیوز جلدی کشور از استان فارس گزارش می‌شود. آمارها نشان داد در سال‌های گذشته شیوع بیماری بیشتر در روستاهای جنوب استان فارس و مربوط به شهرستان‌های خنج، فرشبند و لار بود؛ اما در دو سال اخیر مواردی از بیماری در شهر شیراز و مناطق شمالی آن مشاهده شد. شهرستان مرودشت یکی از شهرستان‌های

استان فارس است که در شمال شیراز واقع شده و آب و هوای آن در نواحی کوهستانی سردسیر و در سایر نواحی معتدل می‌باشد. با توجه به اینکه تاکنون مطالعه‌ای در خصوص شناسایی عامل لیشمانیوز پوستی باهدف قرار دادن KDNA در این شهرستان صورت نپذیرفته است، از این رو در طی این پژوهش به شناسایی عامل سالک با استفاده از روش مولکولی و همچنین بررسی اطلاعات دموگرافیک پرداخته شد.

مطالعات مختلف نشان داد، روش‌های مولکولی PCR مبتنی بر DNA کینتوپلاست انگل لیشمانیا، روش حساسی در تشخیص بیماری به‌ویژه در موارد مزمن است (۲۰، ۲۱). از توالی‌های ثابت جهت تشخیص جنس و از توالی‌های متغیر جهت تشخیص گونه استفاده می‌گردد (۲۲). شناسایی مولکولی با استفاده از KDNA و با توجه به تک مرحله‌ای بودن و سهولت کاربرد، می‌تواند جهت تعیین گونه انگل لیشمانیا به کار رود (۲۳). در سال‌های اخیر مطالعات دقیقی در زمینه شناسایی مولکولی عامل لیشمانیوز در سطح کشور صورت پذیرفته است.

پقه و همکاران، در طی مطالعه‌ای با استفاده از پرایمرهای عمومی RV1 و RV2 و پرایمرهای اختصاصی LINR4 و LIN17 به ترتیب به تکثیر قطعه ثابت و متغیر از حلقه‌های کوچک DNA کینتوپلاستی جهت تشخیص جنس و گونه لیشمانیا پرداختند که نتایج مطالعه آنان لیشمانیا ماژور را به عنوان عامل سالک در استان گلستان معرفی کرد (۲۴). طول این قطعه در انواع مختلف لیشمانیا متفاوت است. با توجه به طول حرکت باند طی الکتروفورز بر ژل آگاروز گونه لیشمانیای مربوط به هر ایزوله شناسایی می‌گردد. طول این قطعه در مورد لیشمانیا تروپیکا در حدود ۷۵۰ جفت باز است؛ و در مورد لیشمانیا ماژور ۶۸۰ جفت باز است (۲۳، ۲۴). در مطالعه حاضر، اندازه قطعات حاصل از ژن KDNA برای لیشمانیا ماژور 650 bp گزارش شد که با مطالب قبلی مطابقت داشت.

با توجه به نتایج این مطالعه لیشمانیا ماژور به عنوان تنها عامل بیماری لیشمانیوز جلدی در شهرستان مرودشت تأیید شد. در استان گلستان نیز در مطالعه‌ای؛ با استفاده از روش مولکولی PCR لیشمانیا ماژور به عنوان عامل سالک

جنبه‌های اپیدمیولوژیکی نظیر جنس، سن، شغل، محل زندگی، محل ضایعه، تعداد ضایعه، سابقه مسافرت، سابقه مصرف دارو، سابقه سالک، دارا بودن حیوان خانگی در بین ۱۳۳ بیمار تأیید شده به عنوان لیشمانیوز پوستی مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گیرد.

از نظر جنسیت بیشتر بیماران را مرد ۶۷ نفر (۵۰/۴٪) تشکیل دادند؛ که از این نظر با یافته‌های دیگر در شیراز و سایر استان‌های هم‌جوار همخوانی داشت. در مطالعه حاضر میانگین سنی مبتلایان $31/62 \pm 20/33$ سال بود. گروه سنی $44/50 - 27/26$ سال با ۳۶ مورد (۲۷/۱٪) بیشترین و گروه سنی بالای $61/76$ سال با ۸ مورد (۶٪) کمترین تعداد بیماری را داشتند. در واقع این همان گروه سنی فعال جامعه است که به دلایلی از جمله کار و فعالیت در خود کانون‌ها و یا کانون‌های نزدیک فعالیت جوندگان و پشه خاکی‌ها در معرض انتقال بیماری قرار می‌گیرند. اصولاً در جمعیتی که در نواحی نزدیک و نه کانون عفونت زندگی می‌کنند معمولاً بالغین بزرگسال که با هدف کار وارد آن نواحی اندمیک می‌شوند در معرض بیشترین خطر ابتلا می‌باشند.

سبک زندگی روستایی، هم‌جواری با محل‌های پرورش دام، وجود زمین‌های خاکی در اطراف منازل مسکونی از جمله عواملی می‌تواند باشد که زمینه را برای زاد و ولد پشه خاکی در این شهرستان فراهم کرده و به تبع آن بیماری سالک در این شهرستان را به یک معضل بهداشتی تبدیل کرده است. لذا برنامه‌های کنترلی و پیشگیری و اقداماتی نظیر آموزش بهداشت و اقدامات مربوط به بهداشت محیط می‌تواند در این زمینه کارساز واقع گردد. تهیه نقشه در مورد موارد سالک می‌تواند مقامات بهداشتی را در درک بهتر اطلاعات در مورد توزیع مکانی و وقوع زمانی در این منطقه و همچنین سایر مناطق کمک کند. بنابراین می‌بایست در مراقبت اپیدمیولوژیک بیماری لیشمانیوز، توجه بیشتری به عامل مکان به عنوان یک عامل تأثیرگذار، گردد. از آمار و ارقام بدست آمده در این بررسی می‌توان نتیجه‌گیری کرد که مرودشت یکی از کانون‌های مهم و با آلودگی بالا در استان فارس می‌باشد و با توجه به نتیجه آزمایش مولکولی می‌توان شهرستان مرودشت را به عنوان کانون لیشمانیوز روستایی (مرطوب) با عامل لیشمانیا ماژور به حساب آورد.

تعیین گردید (۲۵)؛ که از این نظر دو مطالعه با هم همخوانی داشتند. مطالعه حاضر نخستین پژوهش جهت تعیین عامل بیماری لیشمانیوز جلدی در بیماران شهرستان مرودشت باهدف قرار دادن ژن KDNA بود. در واقع می‌توان گفت اکثر مطالعات در این شهرستان در مورد سالک بر اساس اطلاعات بالینی و روش‌های پارازیتولوژی صورت گرفته است.

در این مطالعه شکل ظاهری برخی از ضایعات خشک و شبیه به ضایعات ناشی از لیشمانیا تروپیکا بود؛ اما پس از آزمایش‌های مولکولی لیشمانیا ماژور عامل بیماری تشخیص داده شد؛ بنابراین فقط بر اساس ظاهر ضایعات نمی‌توان قضاوت کرد و به تعیین گونه انگل پرداخت؛ از این رو اهمیت شناسایی مولکولی و تعیین توالی سکانس‌های مربوطه دوچندان می‌شود.

مطالعه مراغی و همکاران در خوزستان؛ با استفاده از روش Nested-PCR انگل لیشمانیا ماژور را به عنوان عامل سالک در شهرستان شوش معرفی کرد (۲۶). در مطالعه شیرین و همکاران روش Nested-PCR جهت تکثیر قطعه متغیر حلقه‌های کوچک KDNA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی گونه LINR4، LIN17 و LIN19 برای تشخیص گونه‌های لیشمانیا مورد استفاده قرار گرفت (۲۷).

در مطالعه‌ای Veland و همکاران به تشخیص KDNA با استفاده از PCR در نمونه‌های ادراری بیماران مبتلا به لیشمانیوز پوستی در پرو پرداختند؛ نتایج آنان نشان داد که از تعداد ۶۸ بیمار با تشخیص لیشمانیوز پوستی، تنها در ۱۸ (۲۱٪) مورد KDNA لیشمانیا وینیا قابل شناسایی بود. در طی این پژوهش حساسیت و اختصاصیت این روش به ترتیب $20/9\%$ و 100% گزارش شد (۲۸).

در مناطق مختلف جهان از جمله ایران، مطالعات زیادی در خصوص جنبه‌های مختلف بیماری سالک از جمله جنبه‌های اپیدمیولوژیک با تأکید بر اپیدمیولوژی توصیفی سن، جنس، شغل و ... با نتایج مشابه و گاهی متفاوتی انجام شده است. در مطالعه حاضر که به صورت توصیفی - مقطعی انجام شد، سعی گردید با استفاده از آمار و اطلاعات جمعیتی موجود، وضعیت بیماری سالک از نظر برخی

تعارض منافع

این پژوهش هیچ‌گونه تعارض منافع را در بر نخواهد داشت و نتیجه رساله دانشجوی کارشناسی ارشد خانم الهام اسفندیاری می‌باشد و منبع مالی حمایتی به دنبال نداشته است.

نتایج بیانگر این است که بیماری از یک بروز فصلی برخوردار بوده است، به نحوی که بیماری بیشتر در دو فصل تابستان و پاییز مشاهده شد.

تشکر و قدردانی

در پایان از همکاری مسئولین و کارکنان مرکز بهداشت شهرستان مرودشت و بخش انگل‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی شیراز و همچنین افراد بیمار مبتلا به لیشمانیا که ما را در انجام این پژوهش یاری دادند، تشکر می‌نماییم.

References

1. Limeira CH, Alves CJ, Azevedo SS, Santos CS, Melo MA, Soares RR, et al. Clinical aspects and diagnosis of leishmaniasis in equids: a systematic review and meta-analysis. *Rev Bras Parasitol Vet* 2019; 28(94):574-81.
2. Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 2012; 7(5):e35671.
3. Reithinger R, Dujardin JC. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J Clin Microbiol* 2007; 45(1):21-5.
4. Tashakori M, Kuhls K, Al Jawabreh A, Mauricio I, Schönian G, Farajnia S, et al. Leishmania major: genetic heterogeneity of Iranian isolates by single strand conformation polymorphism and sequence analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer. *Acta Trop* 2006; 98(1):52-8.
5. Matsumoto PS, D'Andrea LA. The use of the geographic scale in health: the scales of visceral leishmaniasis. *Ciência & Saúde Coletiva* 2019; 24(10):3825-36.
6. Kone AK, Niaré DS, Piarroux M, Izri A, Marty P, Laurens MB, et al. Visceral Leishmaniasis in West Africa: clinical characteristics, vectors, and reservoirs. *Journal of Parasitology Research* 2019; 5:1-8.
7. Yan-Ling Z, Xin Z, Zhi-Guo Y. Epidemiological screening of an epidemic of imported cutaneous leishmaniasis in Luoyang City. *Zhongguo Xue Xi Chong Bing Fang Zhi Za Zhi* 2019; 31(4):418-22.
8. Akhouni M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, et al. A historical overview of the classification, evolution and dispersion of Leishmania parasites and sandflies. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10(3):e0004349.
9. Hakkour M, El Alem MM, Hmamouch A, Rhalem A, Delouane B, Habbari K, et al. Leishmaniasis

- in Northern Morocco: Predominance of *Leishmania infantum* Compared to *Leishmania tropica*.
10. BioMed Research International 2019; 2019(506):1-14.
 11. Hoseini SG, Javanmard SH, Zarkesh SH, Khamesipour A, Rafiei L, Karbalaie K, et al. Regulatory T-cell profile in early and late lesions of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. J Res Med Sci 2012; 17(6):513-8.
 12. Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe C. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. J Clin Microbiol 2006; 44(4):1435-9.
 13. Pourmohammadi B, Mohammadi-Azni S, Kalantari M. Natural infection of *Nesokia indica* with *Leishmania major* and *Leishmania infantum* parasites in Damghan city, Northern Iran. Acta Trop 2017; 170:134-9.
 14. Moradzadeh R, Golmohammadi P, Ashraf H, Nadrian H, Fakoorziba MR. Effectiveness of Paromomycin on Cutaneous Leishmaniasis in Iran: A Systematic Review and Meta-Analysis. Iran J Med Sci 2019; 44(3):185-95.
 15. Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. Trans R Soc Trop Med Hyg 2001; 95(3):239-43.
 16. Murray HW, Berman JD, Davis CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. Lancet 2005; 366(9496):1561-77.
 17. Rajni E, Ghiya BC, Singh S, Shankar P, Swami T, Jadon DS, et al. Cutaneous leishmaniasis in Bikaner, India: Clinicoepidemiological profile; parasite identification using conventional, molecular methods and CL Detect™ rapid test, a new Food and Drug Administration-approved test. Trop Parasitol 2019; 9(2):115-23.
 18. Rohrig E, Hamel D, Pfister K. Retrospective evaluation of laboratory data on canine vector-borne infections from the years 2004-2008. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 2011; 124(9-10):411-8.
 19. Akhouni M, Downing T, Votýpka J, Kuhls K, Luke J, Cannet A, et al. Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. Mol Aspects Med 2017; 57: 1-29.
 20. Conter CC, Mota CA, Dos Santos BA, de Souza Braga L, de Souza Terron M, Navasconi TR, et al. PCR primers designed for new world *Leishmania*: A systematic review. Experimental Parasitology 2019; 207:107773.
 21. Karamian M, Motazedian MH, Fakhar M, Pakshir K, Jowkar F, Rezanezhad H. Atypical presentation of Old-World cutaneous leishmaniasis, diagnosis and species identification by PCR. J Eur Acad Dermatol Venereol 2008; 22(8):958-62.
 22. Fakhar M, Mikaeili F, Hatam GR, Motazedian MH, Habibi P, Fallah E. Application of superior enzymatic systems for characterization of causative agents of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Iran using isoenzyme electrophoresis. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences 2009; 19(70):41-8. [In Persian].
 23. Pagheh AS, Fakhar M, Mesgarian F, Rahimi-Esboei B, Badiiee F. Incidence trend of rural cutaneous

- leishmaniasis in Gonbad-e- Qabus city, (Golestan, Iran) during 2009-2012. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences* 2013; 23(104):27-33. [In Persian].
24. Karamian M, Faroghi Bojd MS, Hemmati M, Saadatjoo A, Barati DA. Molecular identification of cutaneous leishmaniasis agents in Birjand, Iran. *Journal of Birjand University of Medical Sciences* 2013; 20 (2):183-190. [In Persian].
 25. 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; 22(1):85-92. [In Persian].
 26. Baghaei A, Jasbi E, Akhoundi M, Mirzaei H, Dehnam O. Microscopic and molecular detection of leishmania species among suspected patients of cutaneous leishmaniasis using ITS-r DNA in Fars Province. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences* 2012; 20(4):464-73. [In Persian].
 27. Maraghi S, Samarbaaf Zadeh A, Sarlak AA, Ghasemian M, Vazirianzadeh B. Identification of cutaneous leishmaniasis agents by nested polymerase chain reaction (Nested-PCR) in Shush City, Khuzestan Province, Iran. *Iranian J Parasitol* 2007; 2(3):13-5.
 28. Shirian S, Oryan A, Hatam GR, Panahi S, Daneshbod Y. Comparison of conventional, molecular, and immunohistochemical methods in diagnosis of typical and atypical cutaneous leishmaniasis. *Arch Pathol Lab Med* 2014; 138(2):235-40.
 29. Veland N, Espinosa D, Valencia BM, Ramos AP, Calderon F, Arevalo J, et al. Polymerase chain reaction detection of *Leishmania* kDNA from the urine of Peruvian patients with cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2011; 84(4):556-61.

Afzalipour Journal of Clinical Research/ Vol. 2/ Issue 2-1/ Spring 2018

DOI:

Title of Manuscript: Survey of Epidemiology and Molecular Identification of Cutaneous Leishmaniasis in Marvdasht County, Fars Province**Elham Esfandiari¹, Elham Moazamian^{2*}, Hadi Abdolazaimi³**

Received: 2019 Mar 29

Accepted: 2020 Feb 28

Published: 2020 Apr 8

Original Article**Abstract**

Background: Leishmaniasis is one of the zoonosis diseases between humans and livestock that is caused by different species of protozoan of Leishmania genus and, due to its species and host immune response, produces various clinical forms. The aim of this study was to determine the molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Marvdasht city.

Methods: This descriptive cross-sectional study was conducted on 333 suspected cases of cutaneous leishmaniasis referring to the health network of Marvdasht city. After the smear was prepared from the patient's lesion and Gimsa staining, the parasite amastigotes were observed using a light microscope. Polymerase chain reaction (PCR) was performed using specific primers LIN4 and LIN17 to amplify the KDNA gene.

Results: Leishmania parasites were confirmed by microscopic and molecular methods in 133 samples. The PCR results showed that the causative agent in all 133 samples was leishmania major. By analyzing Patients' demographic data and spatial distribution revealed that the occurrence of the disease in men (50/4%), summer (60/3%), September (29/3%), age group 27/26-44/50 (27/1%), housewives (24.8%) and rural (53/4%) were more than other groups. The hands (38/3%) were the most affected. Most patients (50%) had a lesion in their limbs.

Conclusion: The cutaneous leishmaniasis samples obtained in Marvdasht city are mainly rural leishmaniasis, that in this type, the reservoir of disease is wild rodents, especially rats. Therefore, in order to control and prevent this disease, the fight against rodents as one of the most important control strategies should be given priority

Keywords: Cutaneous leishmaniasis, Marvdasht, Leishmania major, Human infection

Citation: Esfandiari E, Moazamian E, Abdolazaimi E. **Title of Manuscript: Survey of Epidemiology and Molecular Identification of Cutaneous Leishmaniasis in Marvdasht County, Fars Province.** Afzalipour J Clin Res 2020; 2(2-1):21-32.

1. MS.c, Department of Microbiology, School of Sciences, Agriculture and Modern Technology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

2. Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Sciences, Agriculture and Modern Technology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

3. Assistant Professor, Department of Agriculture, School of Sciences, Agriculture and Modern Technology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

Corresponding Author: Elham Moazamian **Email:** elhammoazamian@gmail.com

Address: Department of Microbiology, Islamic Azad University, Shiraz Branch

