

## وجود اشکال متفاوت آماستیگوت های لیثمانیا میجر با تنوع ژنتیکی پایین در افراد مبتلا به لیثمانیوز جلدی در استان خوزستان

سید شجاع سلطان<sup>۱،۲</sup>، عادل اسپوتین<sup>۳\*</sup>، سحر ابراهیمی<sup>۱</sup>، الناز علایی نوین<sup>۱</sup>، علی بردبار<sup>۱</sup>، پرویز پرویزی<sup>۱\*</sup>

۱. تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش انگل شناسی آزمایشگاه سیستماتیک مولکولی
۲. دانشگاه علوم پزشکی تهران، مرکز بهداشت تهران جنوب
۳. مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران

\*نشانی برای مکاتبه: تهران - خیابان پاستور - خیابان ۱۲ فروردین - پلاک ۶۹ - کد پستی: ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱، تبریز - خیابان گلگشت - جنب بیمارستان امام رضا - دانشکده پزشکی، نامبر ۰۲۱-۶۴۱۱۲۸۲۵، parpparvizi@yahoo.com، parp@pasteur.ac.ir، adelespotin@gmail.com  
دریافت مقاله: اردیبهشت نود و پنج پذیرش برای چاپ: شهریور نود و پنج

### چکیده

**سابقه و هدف:** لیثمانیوز جلدی به دلیل داشتن اشکال پلی مورفیک آماستیگوت با دامنه ژنتیکی مختلف دارای فنوتیپ های مختلفی می باشد. تنوع مولکولی لیثمانیا میجر و تغییرات مورفولوژیکی آن در میان محققان یک موضوع بحث برانگیز شده است. در این مطالعه جنبه های اشکال پلی مورفیک آماستیگوت در تظاهرات بالینی همراه با تغییرات ژنتیکی انگل در بیماران مشکوک به لیثمانیوز جلدی در استان خوزستان ارزیابی شد.

**روش کار:** از ۳۱۵ بیمار مشکوک طی سالهای ۱۳۹۳-۱۳۹۱ نمونه برداری، تهیه اسمیر و رنگ آمیزی صورت گرفت. پس از استخراج DNA، محصولات PCR حاصل از ژن های ITS-rDNA و Cyt b و Microsatellite با آنزیم اندونوکلاز BsURI طی فرایند RFLP هضم و پس از تعیین توالی گونه های مختلف لیثمانیا با آنالیز مولکولی شناسایی شدند.

**یافته ها:** لیثمانیا تروپیکا و لیثمانیا میجر در بیماران دارای آماستیگوت رایج (بیضی یا گرد) با سایز ۲-۴ میکرومتر در هر زخم خشک، مرطوب یا میکس کلاسیکی شناسایی شدند. در حالیکه اشکال غیر رایج (دوکی، گلابی یا سیگاری شکل) در زخم های غیر کلاسیکی مرطوب با بیشتر از ۴ میکرومتر مشاهده شد. تعیین توالی یابی سکانس های ITS-rDNA و Cytb لیثمانیا میجر تنوع ژنتیکی پایین ( $P > 0.05$ ) به جز هاپلوتایپ شایع (Gene bank access no.EF413075) را نشان نداد.

**نتیجه گیری:** بر اساس یافته های موجود هیچ ارتباط معنی داری بین ویژگیهای فنوتیپی و ژنوتیپی لیثمانیا میجر وجود ندارد. این مطالعه به عنوان اولین گزارش جامع جهت تعیین اشکال مورفومتریک آماستیگوت لیثمانیا میجر در ارتباط با تظاهرات بالینی متفاوت و ویژگی های ژنوتیپی در نظر گرفته شده است.

**واژگان کلیدی:** لیثمانیا میجر، لیثمانیا تروپیکا، اشکال کلینیکی، تغییرات ژنتیکی، خوزستان.

### مقدمه

که به طور عمده عامل ایجاد لیثمانیوز جلدی در ایران می باشند (۳، ۵-۷).

هر چند اخیراً لیثمانیای غیرپاتوژن تورانیکا (*L. turanica*) به عنوان لیثمانیای جلدی مشترک بین انسان و جوندگی تلقی می شود اما محققین آن را به عنوان عامل ایجاد کننده لیثمانیوز جلدی در نظر نمیگیرند (۸). هتروژنیسیته/هموزنیسیته انگل تک یاخته باعث ایجاد محدوده فنوتیپی متنوع از جمله تظاهرات بالینی یا حتی تنوع ویژگی های مورفومتریکی در تریپانوزومیده می شود (۹-۱۱). میزبان ناقل در لیثمانیوزهای از پشه های خانواده سایکوبیده شامل

لیثمانیازیس یکی از بیماری های مشترک بین انسان و دام است و جزو بیماری های فراموش شده نواحی استوایی با تظاهرات بالینی متفاوت در ایران و جهان است (۱). انگل لیثمانیا از خانواده تریپانوزومیده است و از میزبان مخزن به انسان توسط نیش پشه حاکی انتقال می یابد (۲-۴).

در ایران سه شکل اپیدمیولوژیکی لیثمانیوز پوستی مشترک انسان و جوندگی - لیثمانیوز پوستی شهری و لیثمانیوز احشایی مشترک انسان و سگ گزارش شده که به ترتیب اهمیت اپیدمیولوژیکی سه عامل لیثمانیا میجر، لیثمانیا تروپیکا و لیثمانیای اینفانتوم بوده،

اوایل تیر و اوایل پاییز است. نصف بیشتر استان های ایران (۲۰٪ از ۳۱ استان) دارای توزیع متفاوت (۳۷/۹٪-۱/۸٪) می باشد که ۹۰٪ شامل شناسایی، جداسازی و تشخیص انگل لیشمانیا در انسان، میزبان مخزن پستانداران و صید پشه خاکی می پردازد.

### روش کار

شمال استان خوزستان چهار منطقه جغرافیایی (شوش، دزفول، شوشتر و اندیمشک) در 327N به سمت 4820'E و 4831'E شامل ۲۲ روستا و ۶ منطقه (شامل: هفت تپه، شورخه، الجزایر، بنادر، سید رحیمه، منتظری، سن کریم، آخراسفالت، هور، شیخ نادر، چغازنبیل، جوهی، مراغیه، سید رازی در شوش؛ زاویه مرادی، دیلامیوقلاه، خیبر، بهشتی، چغاپهن، گومیش بد، باغچه بان، حمزه آرون، فضیلی در دزفول؛ گاله گاه و ظلای در شوشتر و اندیمشک) و سه منطقه جغرافیایی در غرب (دشت آزادگان - سوسنگرد و هویزه) و روستاهای اطراف آن در 317' به 325' و 4741'E به 4830'E (شامل روستاهای دشت آزادگان: شاکریه، جلیلیه، آلبو افری، مالل دیه، کوی عابدی، هویزه و فرنگیان در دشت آزادگان) دو منطقه در شرق رامهرمز و رامشیر (روستاهای دره خوش، شاردین و شمیلان در رامهرمز) و مرکز اهواز (شامل روستاهای اهواز: کتاب دوله، دامنه، کوچک اعشاری بزرگ، باهنر، شیبان، کوی ابوذر، کیان آباد، شهرک، برق، پاداد، صادقیه ملاشیه، امانیه، چهارصد دستگاه، کوی نبوت، حاجیه، سودانی و مرکز بوستان) به عنوان کانون های ZCL انتخاب شده است. بعضی از مکان های مورد بررسی بیشتر در مرز عراق و ایران در 10566 km<sup>2</sup> و 12-21 متر بالاتر از سطح دریا قرار دارند. شرایط محیطی و آب وهوایی مناطق مورد مطالعه از بقیه مناطق کانون های لیشمانیای پوستی در ایران با دامنه دمایی 20-60 درجه سانتی گراد و رطوبت 95٪ در تابستان و میانگین بارندگی ماهانه 17-25 میلیمتر متفاوت است.

نمونه برداری از زخم بیماران مشکوک به CL در سال 1391 تا 1393 در مناطق ذکر شده انجام شد. اطلاعات هر یک از بیماران مشکوک به صورت جداگانه در برگه هایی نوشته شد. اطلاعات ثبت شده شامل سن، جنس، مدت ابتلا به زخم، تعداد و نوع زخم، مکان زخم، سابقه مسافرت به مناطق اندمیک ZCL و همچنین سابقه مصرف دارو بود (۶، ۸). نمونه برداری از زخم های دارای اشکال متفاوت از بیماران مشکوک انجام و از هر زخم دو اسمیر بر روی لام تهیه شد. پس از خشک شدن اسمیرهای تهیه شده در مجاورت هوا، لام مربوطه با متانول فیکس و با گیمسا رنگ آمیزی شد و در انتها همه اسمیر های جمع آوری شده زیر میکروسکوپ مجهز به میکرومتر چشمی با بزرگ نمایی 1000 بررسی شدند. هر لام مثبت برای تراکم آماستیگوت از +1 تا +6 درجه بندی شد (۲۱).

سروریت به بعضی از نمونه ها به صورت زیرپوستی به انتهای دم Balb/c تلقیح شد و به صورت هفتگی به مدت ۶ ماه ظاهر زخم در محل القای زخم بررسی شد و بعضی از سروریت به از افراد مشکوک

فلبوتوموس پاپاتاسی (*Phlebotomus papatasi*) و لوتزومیا (*Lutzomyia*) است که دارای حداکثر فعالیت در اردیبهشت تا لیشمانیوزهای گزارش شده متعلق به Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis (ZCL) می باشد. همچنین تعداد موارد گزارش شده (مورد در سال) و تخمین سالانه ابتلا به لیشمانیوز پوستی به ترتیب ۲۶۶۳۰ و ۶۹۰۰۰ تا ۱۱۳۳۰۰ می باشد (۱، ۱۲). علاوه بر آن لیشمانیا میجر مهمترین عامل لیشمانیوز پوستی است و همچنین پشه خاکی های فلبوتوموس پاپاتاسی به عنوان ناقلین و چونده های رومبومیس اپیموس، مریونس لیبیکوس، مریونس هوربانه، تاترا ایندیکا و نزوکیا ایندیکا به عنوان میزبان مخزن ZCL در مناطق مختلف ایران گزارش شده است (۴، ۱۳-۱۴).

یکی از مناطق اندمیک فراموش شده با درصد عفونت بالای لیشمانیا استان خوزستان واقع در جنوب غربی ایران است که هم مرز با عراق می باشد و مکانی است که حداقل سه گونه لیشمانیا میجر، لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا اینفانتوم در آن مناطق تایید شده است (۱۵). میزان شیوع بالای لیشمانیوزیس در این منطقه توجه زیادی از محققان را برای تحقیق در این مناطق برانگیخته است. علاوه بر آن محدودیت هایی از جمله انتقال و نگهداری نمونه ها به علت افزایش دما و رطوبت، مناطق صعب العبور کانون های لیشمانیا خیز و امن نبودن مکانی برای نمونه برداری باعث شده که در استان خوزستان مطالعه جامعی در رابطه با بیماریزایی لیشمانیا صورت نگرفته باشد (۱۶). بعد از جنگ تحمیلی ایران-عراق (۱۹۸۰-۱۹۸۸) بازسازی و شهرک سازی در مناطق جدید باعث ایجاد تغییراتی در اکولوژی مخازن میزبان-ناقل و انگل در سه منطقه مهم در شمال، مرکز و جنوب استان خوزستان شد. یکی از مناطق مهم تحت حمله شمال خوزستان بود که شامل شوش، دزفول، اندیمشک، شوشتر و مناطق روستای اطراف آن ها بود که میزان عفونت لیشمانیا در این مناطق به صورت فزاینده ای بالا است. مطالعه حاضر به بررسی اشکال متفاوت آماستیگوت با خصوصیات مختلف در افراد مبتلا به لیشمانیوز جلدی در استان خوزستان شامل شناسایی، جداسازی و تشخیص انگل لیشمانیا در انسان می پردازد.

برای ارزیابی تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی تعدادی از مارکرهای هسته ای و میتوکندریایی مانند مینی اگزون-18S rRNA لوکوس ژن گلیکوپروتئین ۶۳، میکروساتلایت (سکانس هایی با توالی کوتاه با توزیع فراوان در DNA گونه های لیشمانیا که در تشخیص انگل دارای اختصاصیت بالا می باشند) ITS-rDNA.HSP70 (به دلیل داشتن مناطق حفاظت شده و پلی مورفیسم داخل سلولی کم برای پی بردن به روابط تکاملی در لیشمانیا کاربرد دارد)، DNA مینی سیرکل یا کینتوپلاست و *Cyt b* (kdNA maxi circle) (ساب یونیت کاتالیتیکی کوینول متعلق به ژنوم میتوکندریایی در مطالعات فیلوژنیک با ارزش میباشند) استفاده می شود (۱۷-۲۰).

مطالعه حاضر به بررسی اشکال متفاوت آماستیگوت با خصوصیات مختلف در افراد مبتلا به لیشمانیوز جلدی در استان خوزستان

میکرولیتر Ssp1، ۱۰ میکرولیتر PCR product، ۲ میکرولیتر از بافر 10 X و ۱۶ میکرولیتر آب مقطر برای ۴ ساعت (هضم تاخیری) در ۳۷ درجه سانتی گراد برای ژن ITS-rDNA و ۵ دقیقه (هضم سریع) در همان دما برای ژن Cyt b انجام شد. سویه های استاندارد WHO برای لیشمانیا میجر (HOM/SU/73/5ASKH)، لیشمانیا اینفانتوم (MHOM/TN/80/IPT1) و لیشمانیا تروپیکا (MHOM/TN/80/IPT1) به عنوان کنترل مثبت استفاده شدند و یکی از لوله های کنترل منفی فاقد PCR product و دیگری فاقد آنزیم محدودالایتر بود. بعد از هضم محصولات PCR، قطعات DNA روی ژل آگارز ۳٪ حاوی اتیدیوم بروماید ران و از Ladder ۵۰-۱۰۰ bp (بیس پیر) استفاده شد. به منظور آنالیز و مقایسه حساسیت باندهای PCR از DNA مورد نظر تعیین رقت (Serial Dilution) ۱:۱، ۱:۲، ۱:۴، ۱:۸، ۱:۱۶ و شدت باند محصولات PCR برای هر یک از ژن ها در رقت های مختلف بر اساس طول کروماتوگرام و با استفاده از نرم افزار version 3.0 Gel Analyzer محاسبه شد.

اطلاعات مستقیماً از محصولات PCR به منظور شناسایی تنوع لیشمانیا (گونه یا هاپلوتاایپ) در بیماران مبتلا آنالیز شد. تعدادی از محصولات PCR تکثیر شده از ژن ITS-rDNA انگل لیشمانیا از بیماران مشکوک برای تایید و تصدیق نتایج RFLP در هر دو جهت توالی (رفت و برگشت) با پرایمرهای ITS2R4-ITS1F-LCBF1- LCBR2سکانس (توسط دستگاه ABIPRISM3130GeneticAnalyzer automated sequencer (Applied Biosystem USA) و با استفاده از نرم افزار Sequencher 4.1.4 ویرایش و مقایسه همردیفی از نظر همولوژی (Aligned) صورت گرفت که منجر به تایید قطعی گونه های لیشمانیا گردید. علاوه بر آن از نرم افزار MEGA V5/05 برای آنالیز فیلوژنیک هاپلوتاایپ های جدید و رایج و مقایسه با سکانس های همه گونه های منطقه ای در مورد همولوژی و مشابهت در موقعیت های مورد توافق در ژن های ثبت شده در GeneBank استفاده شد (۲۲) و نمودارهای مربوطه با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism 5 (California, USA) رسم شدند.

#### یافته ها

از میان ۱۵۰ بیمار مشکوک به عفونت لیشمانیا (شکل ۱) در میان جمعیت ۸۱ هزار نفری مناطق گروه اول (دشت آزادگان، سوسنگرد و رامشیر)، ۱۳۷ نفر (۹۱/۳٪) و همچنین از میان ۱۶۵ بیمار مشکوک به لیشمانیا در مناطق گروه دوم (شوش،

را در محیط Novy-macneal-Nicolle (NNN) کشت داده شدند و نمونه هایی که دارای زخم فعال بودند به مدت ۶ هفته در دمای ۲۲ درجه سانتیگراد انکوبه شدند و به صورت هفتگی نمونه ها از نظر رشد و حضور پروماستیگوت ها به طور منظم مورد بررسی قرار گرفت. آزمایشات مربوط به حیوانات یا موارد انسانی توسط کمیته بررسی هیات دبیره اخلاق انستیتو پاستور ایران (شماره ۶۰۵) مورد تایید قرار گرفت. لام های رنگ آمیزی شده با گیمسا با اتانول شستشو داده شدند و سپس با ۳۰۰ میکرولیتر از Lysis buffer پوشانده شدند و در دمای ۵۶ درجه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند (به جای استفاده از پروتیناز K) سپس این اسمیر ها کاملاً به لوله های 1.5 میلی لیتری انتقال داده شدند و استخراج DNA برای هر بیمار با روش بردبار و پروبیزی انجام و غلظت DNA استخراج شده با نانودراپ (Thermo Scientific Inc., Wilmington, DE) اندازه گیری شد (۸).

برای غربالگری بیماران مشکوک جهت تکثیر ژن سایتوکروم b (880bp)، ITS-rDNA (480bp) و میکروساتلایت (180bp) از Standard-PCR استفاده شد و محصولات آن در ژل آگارز 1/5٪ حاوی اتیدیوم بروماید ران شد و در زیر نور UV باندها مشاهده و جهت غربالگری عفونت لیشمانیا در بیماران مشکوک از تکثیر ژن ITS-rDNA به روش nested-PCR استفاده شد. جفت پرایمرهای IR1 و IR2 پرایمر مرحله اول و ITS1F و ITS2R4 برای مرحله دوم nested PCR استفاده شدند. جزئیات پروتکل PCR مشابه مورد گزارش شده قبلی است (۱۹، ۲۲). آب مقطر دو بار تقطیر به عنوان کنترل منفی و DNA مربوط به لیشمانیا میجر به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

سکانس ژن ITS-rDNA و Cyt b از لیشمانیاهای دنیای قدیم (لیشمانیا میجر EF413078.1-لیشمانیا تروپیکا KC540906 - لیشمانیا اینفانتوم EU330402-لیشمانیا تورانیکا EF413079) لیشمانیا جریبلی (AJ300486) در Gene Bank برای آنالیز سکانس استفاده شد. در این راستا برای استاندارد کردن تعداد و سایز قطعات از نرم افزار CLC DNA work bench 5/2 (CLC bio A/S) استفاده کردیم و از آنزیم محدود الاثر BsuR I, Hae III) با جایگاه برش GG↓CC و Ssp1 با جایگاه برش AAT↓ATT برای تشخیص گونه های مختلف انگل استفاده شد. واکنش در حجم ۳۰ میکرولیتر حاوی ۲ میکرولیتر BsuR I، ۲

جدول ۱. شناسایی آلودگی های لیشمانیوز پوستی در افراد مشکوک به بیماری در شمال خوزستان با توجه به مکان های نمونه گیری و بر پایه آنالیزهای مولکولی

RFLP-PCR (BsuR1) ITS-rDNA از ژن		نمونه های لیشمانیا مثبت بر پایه رنگ آمیزی گیمسا				مکان			استان
دیگر گونه ها (تعداد)	لیشمانیا میجر (تعداد)	تعداد کل	نمونه های منفی	آنالیز مولکولی توسط ژن های ITS-rDNA و Cyt b	مشاهدات میکروسکوپی	ارتفاع (متر)	روستاها	منطقه	
۰	۵	۱۰	۲	۸/۱۰	۷/۱۰	۹۷	هفت تپه	شوش	خوزستان
۰	۷	۸	۱	۶/۸	۷/۸	۹۷	سرخه		
۰	۹	۱۴	۱	۱۳/۱۴	۱۱/۱۴	۹۷	الجزایر		
۰	۲	۲	۰	۲/۲	۲/۲	۹۷	بنادر		
۰	۱	۱	۰	۱/۱	۱/۱	۹۷	سید رحیم		
۰	۲	۲	۰	۲/۲	۲/۲	۹۷	منتظری		
۰	۱	۱	۰	۰/۱	۱/۱	۹۷	سن کریم		
۰	۵	۲۲	۳	۱۸/۲۲	۱۵/۲۲	۹۷	اخراسفالت		
۰	۳	۶	۱	۵/۶	۴/۶	۹۷	حر		
۰	۳	۴	۰	۳/۴	۳/۴	۹۷	شیخ نادر		
۰	۲	۳	۰	۲/۳	۲/۳	۹۷	چوقازنبیل		
۰	۱	۱	۰	۰/۱	۱/۱	۹۷	جوحی		
۰	۳	۳	۰	۲/۳	۳/۳	۹۷	مراغیه		
۰	۳	۴	۰	۴/۴	۳/۴	۹۷	سید رازی		
۰	۷	۸	۰	۸/۸	۷/۸	۱۰۳	زاویه مرادی	دزفول	خوزستان
۰	۴	۶	۰	۶/۶	۵/۶	۱۰۳	دیلم سفلی		
۰	۲	۳	۰	۳/۳	۳/۳	۱۰۳	خیبر		
۰	۴	۷	۳	۴/۷	۳/۷	۱۰۳	بهشتی		
۰	۳	۸	۳	۳/۸	۵/۸	۱۰۳	چوگا پهن		
۰	۲	۲	۰	۲/۲	۲/۲	۱۰۳	گاومیش اباد		
۰	۳	۳	۰	۳/۳	۳/۳	۱۰۳	باغچه بان		
۰	۴	۷	۲	۵/۷	۵/۷	۱۰۳	حمز بیرون		
۰	۲	۴	۱	۳/۴	۳/۴	۱۰۳	فضیلی		
۰	۴	۶	۰	۵/۶	۶/۶	۹۳	گاله گاه	شوشتر	خوزستان
۰	۴	۷	۱	۶/۷	۶/۷	۹۳	فلاحی		
۰	۳	۸	۱	۷/۸	۶/۸	۹۳	شوشتر		
۰	۸	۱۵	۱	۱۴/۱۵	۱۱/۱۵	۱۵۰	اندیمشک	اندیمشک	خوزستان
۰	۹۷)۱۳۵ (۷۲/۸	۱۶۵	۲۰)۱۶۵ (۱۲/۲	۸۱/۸، ۱۳۵)۱۶۵	۷۶/۹، ۱۲۷)۱۶۵	جمع کل			

در نمونه های آلوده گروه دوم بیشترین افراد آلوده در رنج سنی ۵-۱۰ سال (۳۵/۴٪) و همچنین در مردان (۶۹/۳٪) قرار داشت جدول (۱)

دزفول، اندیمشک و شوشتر)، ۱۲۷ نفر (۷۶/۹۶٪) از نظر میکروسکوپی و کشت در محیط کشت NNN آلوده به انگل لیشمانیا بودند. از میان نمونه های مثبت گروه اول، بیشترین گروه آلوده در رنج سنی ۱۵-۲۵ سال (۲۷٪) و در مردان (۶۸/۸٪) و

شکل ۱. زخم های بیماران ناشی از لیشمانیوز ژئونوز پوستی (ZCL) توسط لیشمانیا میجر. الف- زخم کلاسیک-مرطوب، ب- تشکیل ندول اولیه، ج- زخم غیر کلاسیک-مرطوب، د- زخم کلاسیک-مرطوب (تیپیک)



بودند و میانگین سایز لیشمانیا میجر ها در رنج ۳-۵ در طول و  $0.21 \pm 2.15$  در عرض بود اما درجه مثبت بودن انگل های لیشمانیا تروپیکا همگی +۶ بودند.

۳۳٪ از آماستیگوت های شهر های گروه دوم گرد یا بیضوی در زخم خشک و ۱۱٪ آن ها در زخم میکس و ۳۹/۴٪ آن ها در زخم مرطوب (عمدتا در فرم کلاسیک: آتشفشانی شکل، ۸۳/۵٪) مشاهده شدند. در حالی که اشکال آماستیگوت غیر معمول (سیگاری، دوکی و گلابی) در زخم های غیر کلاسیکی مرطوب مشاهده شد (از جمله: هایپر کراتوتیک، اریس پیلاس، اگزوماتوئید و پوستول (۱۶/۵٪). آماستیگوت های غیر معمول گروه دوم دارای سایز غیر معمول با بیشتر از ۴ میکرومتر (۱۶/۵٪) بودند در مقابل اشکال گرد یا بیضی آماستیگوت در دامنه ۲-۳ میکرومتر (۳۱/۵٪) تا ۳-۴ میکرومتر (۵۱/۹٪) شامل زخم های میکس یا زخم مرطوب کلاسیکی یا زخم خشک قرار گرفت.

ضایعات بیماران بر اساس موقعیت های مختلف با بیشترین درصد ابتلا در دست ها (۳۶/۲٪) و بعد در پا (۲۵/۲٪) و در صورت و گردن (۱۴٪) و در بقیه قسمت های بدن (کتف، پا، پشت بدن، زانو و بازو) (۲۴/۴٪) در گروه دوم بود. درجه بندی +۳ (۲۴/۴٪) و +۴ (۲۳/۶٪)

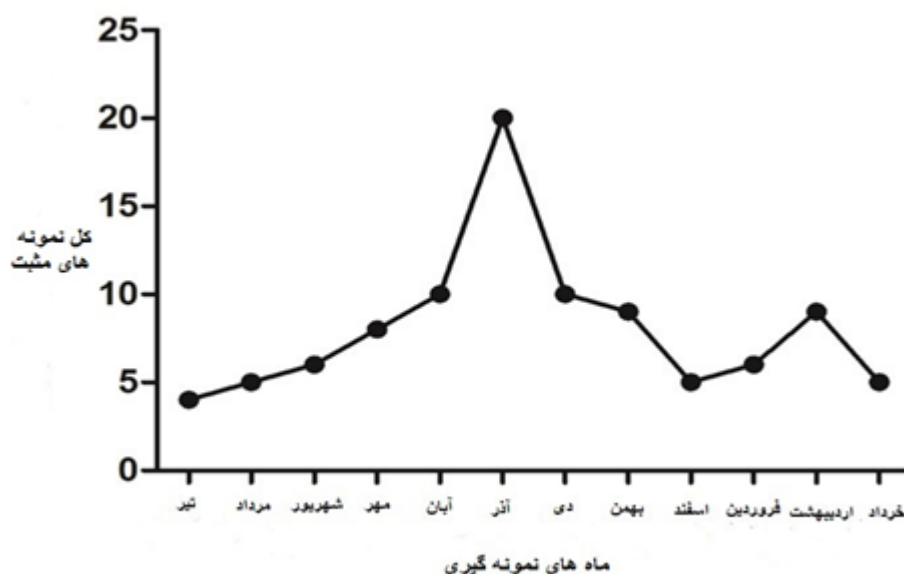
در گروه اول آماستیگوت های لیشمانیا میجر بیشتر دارای اشکال رایج گرد یا بیضی (۸۲/۲٪) با اندازه ۳-۴ میکرومتر و اشکال پلی مورفیک غیر معمول (۱۷/۷٪) با اندازه ۴-۵ میکرومتر در سه نوع زخم خشک، مرطوب و میکس بودند و اشکال آماستیگوت پلی مورفیک تنها در یک فرم زخم مشاهده شد. همچنین گروه دوم آماستیگوت های لیشمانیا میجر در زخم به صورت اشکال پلی مورفیک شامل اشکال معمول: گرد (۱۶/۵٪) و بیضی (۶۶/۹٪) و همچنین اشکال غیر معمول: دوکی شکل (۳/۱۴٪)، سیگاری شکل (۷٪) و گلابی شکل (۶/۳٪) و همچنین در بعضی نمونه ها آماستیگوت ها دارای تازک خارجی بودند و در بعضی نمونه های دیگر آماستیگوت ها به شکل رزت فرم و دوتایی دیده شدند. در کل زخم های مرطوب لیشمانیا میجر به صورت کلاسیکی (آتشفشانی شکل) و غیر کلاسیکی (هرپتیک فرم، اریتروماتوز، پاپول و ندول، هایپرکراتوتیک، زوستری فرم و پسوریازیس فرم) هستند.

۸۰٪ آماستیگوت ها در گروه اول بیشتر در زخم های مرطوب کلاسیکی و ۲۴/۳٪ آن ها در زخم های مرطوب غیر کلاسیکی یافت شد. ۱۰۰٪ آماستیگوت های لیشمانیا تروپیکا با سایز تقریبی  $2-3 \pm 0.23$  میکرومتر در طول و  $0.11 \pm 2.2$  میکرومتر در عرض با اشکال گرد یا بیضی درون زخم های خشک بودند و بیشتر بیماران مبتلا به لیشمانیا میجر دارای درجه +۴ (از بین +۱ تا +۴) (۳۲/۸٪)

بود. در خوزستان برخلاف بقیه ی استان های اندمیک ایران پشه خاکی ها دارای ۲ پیک فعالیت فصلی در هر سال هستند. داشتن درجه حرارت بالا ( $50^{\circ}\text{C}$ ) و رطوبت ۹۵٪ در اواخر زمستان (اوایل ماه مارس) و اواخر تابستان (اواسط سپتامبر) ما را با یک افزایش شدید بروز لیشمانیازیس در آذر ماه مواجه میکند (نمودار ۱).

بیشتر از بقیه بود. پس از بررسی لامها با استفاده از میکرومتر چشمی اندازه های ۳-۲ و ۳-۴ میکرومتر بیشتر از ۴ میکرومتر بود و همچنین اکثریت اندازه گیری ها ۳-۴ میکرومتر (۵۱/۹٪) بود. تعداد افراد مبتلا به زخم لیشمانیا در شوش (۴۸/۸٪) نسبت به دزفول (۲۸/۳٪) و شوشتر (۱۴/۱٪) و اندیمشک (۸/۶٪) بالاتر بود. میزان بروز لیشمانیازیس در آبان-آذر ماه بالا و در خرداد ماه پایین

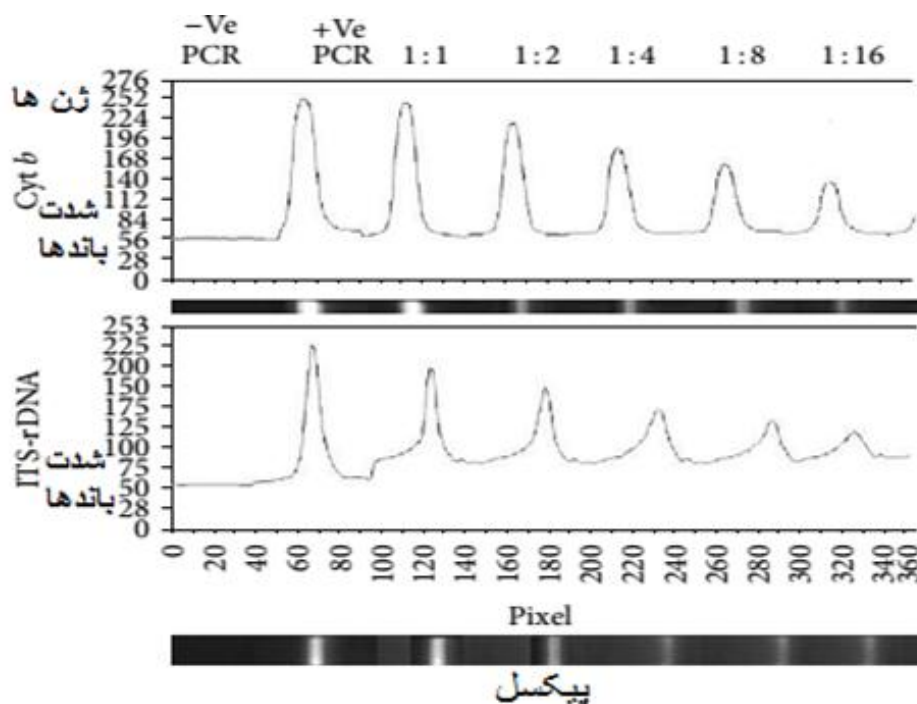
نمودار ۱- میزان موارد مثبت لیشمانیازیس (لیشمانیا میجر) با توجه به ماه های بروز در روستاهای خوزستان شمالی در سال های ۱۳۹۱ تا ۱۳۹۳.



مورفولوژیک آماستیگوت (رایج: بیضی وگرد با سایز ۲-۴ میکرومتر و غیر رایج: سیگاری، دوکی و گلابی شکل با سایز  $>4$  میکرومتر) شناسایی شد. محصول PCR در ژل الکتروفورز بستگی به طول کروماتوم دارد. حساسیت باند های PCR نشان میدهد که ژن سایتوکروم b دارای شدت پیکسل بالاتری (۱۴۰) نسبت به ITS-rDNA (۱۱۰) در کمترین رقت ۱:۱۶ دارد (شکل ۲).

همچنین لیشمانیا میجر و لیشمانیا تروپیکا در سوسنگرد، دشت آزادگان، هویزه و اهواز یافت شد در حالی که لیشمانیا میجر فقط در رامهرمز و رامشیر یافت شد که این به علت توزیع متفاوت نوع گونه پشه خاکی یا مخزن میزبان در منطقه می باشد. فلبوتوموس پاپاتاسی و پارافلبوتوموس سرزنتی در مناطق سوسنگرد، دشت آزادگان و اهواز جمع آوری و شناسایی شدند اما فقط فلبوتوموس پاپاتاسی در رامهرمز و رامشیر پیدا شد. در حالی که جونده تاترا ایندیکا *Tatera indica* و انسان/سگ میزبان مخزن لیشمانیا میجر و لیشمانیا تروپیکا (به ترتیب) هستند. اما در مناطق گروه دوم تنها عفونت شناسایی شده لیشمانیا میجر در فرم های بالینی مختلف کلاسیکی مرطوب و غیر کلاسیکی توام و خشک با پنج شکل

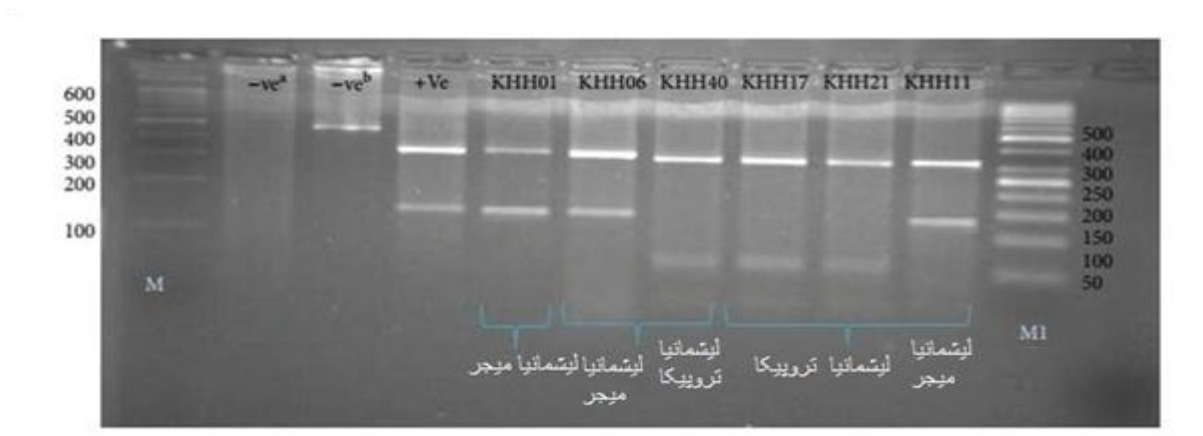
شکل ۲. سنجش حساسیت ۲ باند توسعه یافته توسط PCR بر پایه تهیه رقت سریالی با هدف قرار دادن DNA ژن های *Cyt b* و ITS-rDNA. ۱۰ نانوگرم DNA خالص شده از لیشمانیا میجر بعنوان کنترل مثبت PCR استفاده شد (PCR+). کنترل منفی بدون DNA در هر واکنش PCR استفاده شد (PCR-). شدت هر پیکسل از باندهای PCR با استفاده از نرم افزار "ژل آنالایزر" در ژن های مختلف محاسبه گردید.



آنزیمی شدند و برای تشخیص نوع گونه سکانس شدند که همه ۹۷ نمونه لیشمانیا میجر بودند و ۳۸ نمونه از ۱۳۵ محصول PCR دارای DNA کافی برای توالی یابی نبودند (جدول ۱). روش RFLP در تمایز گونه های انگل به طور مشخص به ما کمک میکند. دو قطعه ۱۴۰ و ۳۴۰ جفت بازی مربوط به لیشمانیا میجر در حالی که چهار قطعه ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۳۴۰ جفت بازی مربوط به لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا تورانیکا؛ و سه قطعه ۵۰، ۷۰ و ۳۴۰ جفت بازی مربوط به لیشمانیا اینفانتوم بدست آمد. سکانس ITS-rDNA و *Cyt b* در مقایسه با موارد موجود در GeneBank کاملا تشابه داشت (شکل ۳).

در این مطالعه در شهر های گروه اول لیشمانیا میجر و لیشمانیا تروپیکا تشخیص داده شدند به طوری که ۱۳۹ بیمار از ۱۵۰ نمونه مشکوک با سه ژن ITS-rDNA (۶۴/۷٪)، *Cyt b* (۲۱/۸٪) و میکروساتلایت (۱۳/۶٪) شناسایی شد. که ۱۰۲ بیمار مثبت شدند و از میان آنها ۹۰ مورد لیشمانیا میجر (۶۴/۷٪) و ۹ مورد لیشمانیا تروپیکا (۶/۴۷٪) بودند. محصول PCR ۳۷ نمونه از ۱۳۹ بیمار (۲۶/۶٪) برای هضم ژن ITS-rDNA با *BsuR I*(HaeIII) و هضم ژن *Cyt b* با *Ssp1* جهت تشخیص نهایی کافی نبود و سه نمونه (۲/۱٪) نامشخص بودند. از ۱۶۵ نمونه جمع آوری شده در مناطق گروه دوم، ۱۳۵ نمونه مثبت شدند. از ۱۳۵ نمونه آلوده به لیشمانیا، ۹۷ نمونه (۷۲/۸٪) با *BsuR I*(HaeIII) و *Ssp1* هضم

شکل ۳- نتایج بدست آمده از PCR-RFLP ژن ITS-rDNA در نمونه های جمع آوری شده از استان خوزستان. ستون اول از سمت چپ، (-vea): کنترل منفی حاوی آنزیم BsuR1 بدون محصول PCR؛ ستون دوم از سمت چپ، (-veb): کنترل منفی حاوی محصول PCR بدون آنزیم BsuR1؛ ستون سوم از سمت چپ، (+ve): کنترل مثبت برای لیثمانیا میجر و KHH01، 06، 011، لیثمانیا میجر (ایزوله های جدا شده از شوش؛ KHH17, 21, 40 (لیثمانیا تروپیکا) ایزوله های جدا شده از اهواز؛ M؛ (سایز مارکر، ۱۰۰bp).

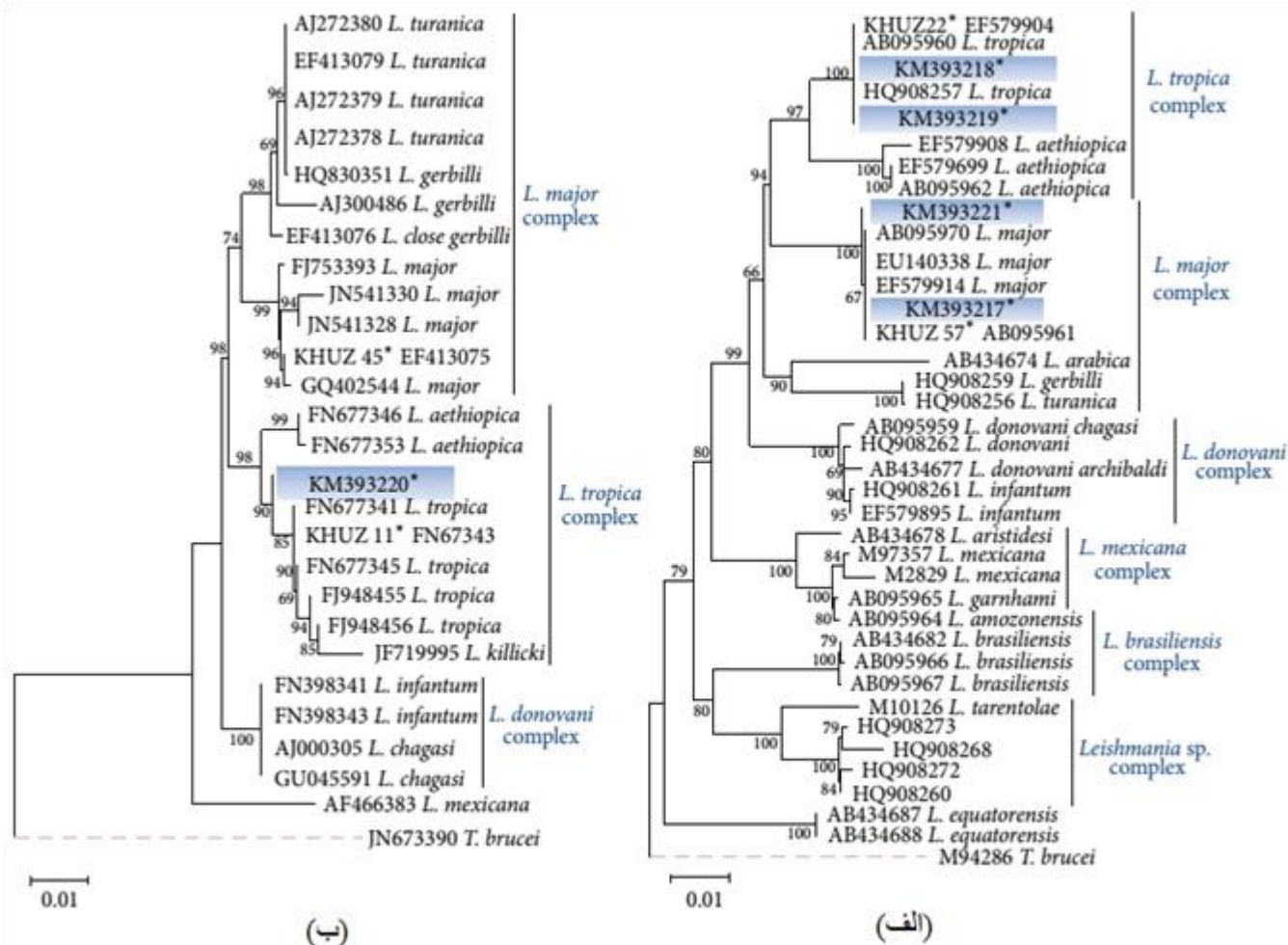


(KHUZ57 (GenBank Accession no. AB095961) و دو هاپلوتایپ دیگر (KHUZ17 and KHUZ19) که جدید و منحصر به فرد بودند (KM393217 و KM393221) و همچنین برای ژن ITS-rDNA، همه توالی های ۲۵ نمونه، مشابه مورد گزارش شده در ژن (GenBank Accession nos. EF413075, AJ300481) بانک بود (شکل ۴).

در مناطق گروه اول ۲۵ نمونه از ۹۰ نمونه مربوط به لیثمانیا میجر و همه ۹ نمونه مربوط به لیثمانیا تروپیکا برای ژنهای ITS-rDNA و *Cyt b* سکانس و توالی یابی شدند. لیثمانیا تروپیکا تنوع مولکولی بیشتری نسبت به لیثمانیا میجر نشان داد. ژن *Cyt b* تنوع بیشتری نسبت به ژن ITS-rDNA هم در لیثمانیا میجر هم در لیثمانیا تروپیکا نشان داد. لیثمانیا میجر دارای سه هاپلوتایپ برای ژن *Cyt b* دارد که یک هاپلوتایپ آن در ۲۳ نمونه به صورت رایج



شکل ۴. فیلوژنی گونه های انگل لیشمانیا بر اساس درخت *maximum-likelihood* و توالی یابی همردیفی هاپلوتایپ های (sequence alignment) (ژن های الف) Cyt b و (ب) ITS-rDNA بوسیله MEGA5.05. فقط مقادیر (bootstrap) بالای ۷۰٪ بر روی هر شاخه نشان داده شده است. مقیاس نشاندهنده تعداد جایگزینی نوکلئوتیدی در هر سایت می باشد. \* = توالی های آنالیز شده در این مطالعه را نشان می دهد.



Co-infection در یک مرد ۲۴ ساله ساکن روستای کوتابدوله (در منطقه اهواز) که دارای لیشمانیا میجر در دست چپ و لیشمانیا تروپیکا در صورت و یک کریبتیدی در زخم دست راست داشت که بسیار جالب توجه است که انگل های مختلف در یک بیمار وجود داشته باشند. بنابراین لازم است هر ضایعه ای برای گونه های مختلف به صورت جداگانه مورد آزمایش قرار گیرد. آنالیز های فیلوژنیک با استفاده از هاپلوتایپ های جدید و مشترک هر دو ژن و مواردی که به Gene Bank تحویل داده شده است با استفاده از نرم افزار MEGA 5.05 انجام شد و تریپانوزوما به عنوان یک شاخه جداگانه در نظر گرفته شد (JN673390 و GenBank Accession nos. M94286).

از ۹ توالی لیشمانیا تروپیکا، سه هاپلوتایپ شناسایی شدند که شش توالی آن دارای هاپلوتایپ رایج KHUZ22 (GenBank Accession no. EF579904) بود و دو هاپلوتایپ دیگر در سه نمونه باقی مانده گزارش شد که دو تا از سکانس ها مربوط به KHUZ02 با KHUZ22 و هاپلوتایپ دیگر (KHUZ05) با شماره دسترسی ژن بانک KM393219 منحصر به فرد بود. برای ژن ITS-rDNA از لیشمانیا تروپیکا دو هاپلوتایپ شناسایی شد که هشت سکانس دارای هاپلوتایپ رایج KHUZ11 (GenBank Accession no. FN677343) و یک هاپلوتایپ جدید در یک سکانس KHUZ07 با شماره دسترسی ژن بانک (KM393220) بود. سه انگل به دلیل کافی نبودن DNA برای توالی یابی یا سکانس غیر قابل خوانش و یا عفونت توأم قابل شناسایی نبود. یک مورد

## بحث

در این مطالعه دوگونه لیشمانیا (لیشمانیا میجر و لیشمانیا تروپیکا) در بیماران مشکوک از مناطق گروه اول (سوسنگرد، دشت آزادگان و هویزه در حاشیه غربی با عراق، اهواز به عنوان مرکز استان خوزستان، رامهرمز و رامشیر در شرق خوزستان) و مناطق گروه دوم (شمال خوزستان) طی دو سال مورد بررسی قرار گرفت. این مطالعه نشان داد که شیوع ZCL در مناطق گروه اول (۱:۱۷) در هر ۱۰ هزار نفر) در مقایسه با گزارشات سابق (۸ نفر در هر ۱۰۰۰۰ نفر) به صورت قابل ملاحظه ای بالا است (۲۳). مشاهدات، گرایش لیشمانیا میجر را برای ایجاد الگوهای بالینی متفاوت در زخمهای کلاسیکی و غیر کلاسیکی و ضایعات خشک برای لیشمانیا تروپیکا را نشان میدهد (۲۴).

عفونت لیشمانیا در مناطق شمال خوزستان به خصوص شوش به دلیل نزدیک بودن لانه جونده به مناطق مسکونی بالا است (۲۴). در شوش پشه خاکی فلیبوتوموس پاپاتاسی که تنها ناقل ZCL در ایران است به فراوانی دیده می شود (۲۵). همچنین در مناطق شمال خوزستان تعداد کمی از آماستیگوت ها با یک تاژک خارجی در بعضی زخم ها مشاهده شد که این ویژگی مربوط به پروماستیگوتی است که پاراماستیگوت نام دارد (۲۶). تاژک خارجی به ندرت در بعضی گونه های انگل در حلق پشه خاکی موجود است (۲۷).

در این مطالعه، در مناطق شمال خوزستان یک ارتباط قابل توجه در میان اشکال آماستیگوت غیر رایج (۱۶/۵۱٪) ( $P < 0/05$ ) با سائز  $> 4$  میکرومتر در زخم های مرطوب غیر کلاسیکی مشاهده شد. همچنین یک ارتباط قوی بین وجود اشکال رایج آماستیگوت (گرد و بیضی،  $4/83/5$ ) ( $P < 0/05$ ) با سائز های متفاوت ۲-۳ و ۳-۴ میکرومتر درون زخمهای خشک-میگس (توام) و مرطوب (عمدتا اشکال کلاسیکی آتشفشانی) مشاهده شد. بنابراین به نظر می رسد که اشکال مورفومتریک غیر رایج آماستیگوت می تواند اثرات قابل توجهی بر روی تغییر شکل زخم های مرطوب غیر کلاسیکی شود.

در این مطالعه سه ژن مختلف برای شناسایی گونه های انگل لیشمانیا استفاده شد. تکنیک مولکولی RFLP برای ژن *Cyt b* با دارا بودن باند واضح PCR با حساسیت بالا (۵دقیقه-تشخیص سریع) در مقایسه با ITS-rDNA و میکروساتلایت قابل اعتماد است که این می تواند به دلیل کپی های بالای (Multi copy) این ژن در هر سلول (۲۰-۵۰ عدد ماکسی سیرکل (Maxi Circle) به اندازه ۲۰-۳۵ کیلو باز) و حضور یک منطقه طولانی غیر معمول کد شونده (۲۰ کیلو باز) شامل ۵ ژن غیر ویرایش شونده MURF1, 12S, COI, ND1 و ژن 9s باشد (۲۸). در این مطالعه گونه های

تشخیص داده نشده لیشمانیا می تواند پاتوژن های میکس (توام) یا غیر پاتوژن با لیشمانیا میجر، تروپیکا یا کریتیدیا باشند (۳۲-۳۴).

همچنین حضور عفونت همزمان به لیشمانیا میجر، لیشمانیا تروپیکا و کریتیدیا در نواحی مختلف بدن یک مرد در استان خوزستان وجود این پاتوژن یا غیر پاتوژن را در بیماران تایید کرده است اما موضوع تعجب آور است که چگونه عامل غیر پاتوژن کریتیدیا باعث ایجاد زخم در دست راست بیمار شده و مشاهده قابل توجه تر اینکه عفونت همزمان در زخم مرطوب برای لیشمانیا تروپیکا و کریتیدیا مشاهده شد که ما انتظار داشتیم تنها لیشمانیا میجر مشاهده شود. همچنین لیشمانیا میجر در انواع زخم های (مرطوب، خشک و توام) شناسایی شد در حالی که ما انتظار داشتیم تنها در زخم مرطوب آن را ببینیم. این مشاهدات غیر منتظره از زخم های مختلف توانایی و گرایش لیشمانیا میجر را برای ایجاد الگوهای بالینی متفاوت در جنوب غربی ایران دارد (۳۵-۳۶).

هیچ ارتباطی آماری معنی داری بین ویژگی فنوتیپی (مورفولوژی) آماستیگوت و ویژگی ژنتیکی آن در لیشمانیا میجر ( $P > 0/05$ ;  $\chi^2$ ) با استفاده از ژن های ITS-rDNA (هسته)، *Cyt b* (میتوکندری) و میکروساتلایت در مناطق گروه اول و دوم از مراکز خوزستان ایران مشاهده نشد و لیشمانیا تروپیکا تنوع ژنتیکی بیشتری نسبت به لیشمانیا میجر براساس ژن های *Cyt b* و ITS-rDNA دارد به طوری که لیشمانیا میجر تنها یک هاپلوتاایپ رایج در مناطق شمال و شرق ایران براساس ژن ITS-rDNA دارد. تنوع اشکال آماستیگوتی متفاوتی در لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا میجر در مرکز خوزستان وجود داشت ولی تنوع ژنتیکی چشمگیری در انگل لیشمانیا میجر مشاهده نشد. اما اشکال آماستیگوت لیشمانیا تروپیکا فقط دارای اشکال رایج بودند ولی دارای تنوع ژنتیکی بر اساس ژن های یاد شده بودند که علت این موضوع در محتوای بالای GC (content) در لیشمانیا میجر (۵۲/۵٪) و باندهای سه گانه هیدروژنی بین بازها و Stacking interaction نسبت به لیشمانیا تروپیکا است (۲۹-۳۱، ۳۷). این یافته ها به صراحت ارتباط بین ویژگی های ژنوتیپی و فنوتیپی CL را در لیشمانیا میجر و لیشمانیا تروپیکا نشان می دهد و میتوان گفت که تغییرات ژنتیکی همیشه بر روی ویژگی های مورفولوژیکی و حتی تظاهرات بالینی تاثیر ندارد (۳۸-۴۱).

چندین فاکتور می تواند به صورت جداگانه در ویژگی بالینی زخم لیشمانیا میجر تاثیر بگذارد که این موارد شامل بیماری های سرکوب کننده سیستم ایمنی، مهاجرت جمعیت غیر بومی، عوامل میزبان، تعداد انگل تلقیح شده، استفاده از استروئید خوراکی، امکان تلقیح و حتی آلودگی زخم با اجزای غیر ارگانیک باشد (۳۸-۳۹). برخی از مطالعات تنوع ژنتیکی را در مینی اگزون عامل CL (لیشمانیا میجر و

لیشمانیا میجر در جنوب غربی ایران دارای ویژگی های مخصوص به خودش است و این شواهد به صراحت نشان می دهد که ویژگی های فنوتیپی لیشمانیا میجر به طور قطعی ارتباطی به دامنه تغییرات مولکولی ندارد. دلیل برجسته وجود زخم های غیر معمول در بیمار مشکوک و تغییر شکل دادن اشکال آماستیگوت رایج را می توان با شیمی درمانی و اثرات پاسخ ایمنی میزبان یا شرایط اکولوژی بر انگل توضیح داد که این فاکتورها می توانند منجر به تشخیص اشتباه شوند با این حال بعضی از نتایج مولکولی منفی یا مشاهده میکروسکوپی مثبت را باید با نقش عوامل مهاری DNA مثل پروتوپورفیرین، DNAase ها و روش استخراج نامناسب اعلام کرد. بر اساس یافته های موجود هیچ ارتباط معنی داری بین ویژگیهای فنوتیپی و ژنوتیپی لیشمانیا میجر و لیشمانیا تروپیکا وجود ندارد. این مطالعه به عنوان اولین گزارش جامع جهت تعیین اشکال مورفومتریک آماستیگوت لیشمانیا میجر در ارتباط بانظواهرات بالینی متفاوت و ویژگی های ژنوتیپی در نظر گرفته شده است.

زنان دیده شد چون مردان بیشتر در مزارع کار می کنند و زنان دارای پوشش حجاب می باشند و میزان عفونت در رده سنی ۵ تا ۱۰ ساله بیشتر از بقیه بود که علت آن می تواند بعلت پاسخ ایمنی پایین TH1 باشد (۴۶).

مطالعات پیشین، عامل اصلی CL را لیشمانیا میجر معرفی می کنند در حالی که مراغی و همکاران لیشمانیا میجر (۹۰٪) و لیشمانیا تروپیکا را (۱۰٪) در این مناطق گزارش کردند (۹، ۱۵، ۴۴). هاجریان با استفاده از ITS-rDNA نشان داد که لیشمانیا تروپیکا ۳/۶٪ پلی مورفیسم و لیشمانیا میجر با ۷/۳٪ تنوع ژنتیکی در ایران وجود دارد (۴۵). در حالی که ما تنوع تنوع ژنتیکی بیشتری در لیشمانیا تروپیکا در مقایسه با لیشمانیا میجر با استفاده از ژن های *Cyt b* میتوکندریایی و ITS-rDNA هسته ای یافتیم که درک صحیحی از تنوع ژنتیکی در میان گونه های لیشمانیا به ما می دهند. یافته های انگل لیشمانیا میجر با تنوع ژنتیکی پایین و ویژگیهای فنوتیپی مختلف نشان دهنده این موضوع است که

## REFERENCES

۱. 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.
۲. Rouhani S, Mirzaei A, Spotin A, Parvizi P. Novel identification of *Leishmania major* in *Hemiechinus auritus* and molecular detection of this parasite in *Meriones libycus* from an important foci of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. *Journal of infection and public health*. 2014;7(3):210-7.
۳. Ready PD. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annual Review of Entomology*. 2013;58:227-50.
۴. Mirzaei A, Rouhani S, Taherkhani H, Farahmand M, Kazemi B, Hedayati M, et al. Isolation and detection of *Leishmania* species among naturally infected *Rhombomis opimus*, a reservoir host of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Turkemen Sahara, North East of Iran. *Experimental parasitology*. 2011;129(4):375-80.
۵. Parvizi P, Alaeenovin E, Kazerooni PA, Ready PD. Low diversity of *Leishmania* parasites in sandflies and the absence of the great gerbil in foci of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Fars province, southern Iran. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2013;107(6):356-62.
۶. Bordbar A, Parvizi P. High density of *Leishmania major* and rarity of other mammals' *Leishmania* in zoonotic cutaneous leishmaniasis foci, Iran. *Tropical Medicine & International Health*. 2014;19(3):355-63.
۷. Mohebalı M. Visceral leishmaniasis in Iran: review of the epidemiological and clinical features. *Iranian journal of parasitology*. ۳۴۸:(۳)۸;۲۰۱۳.

۸. Bordbar A, Parvizi P. High infection frequency, low diversity of *Leishmania major* and first detection of *Leishmania turanica* in human in northern Iran. *Acta tropica*. 2014;133:69-72.
۹. Mahnaz T, Katrin K, Amer A-J, Isabel M, Gabriele S, Safar F, et al. *Leishmania major*: genetic heterogeneity of Iranian isolates by single-strand conformation polymorphism and sequence analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer. *Acta tropica*. 2006;98(1):52-8.
۱۰. Schönian G, Akuffo H, Lewin S, Maasho K, Nylén S, Pratlong F, et al. Genetic variability within the species *Leishmania aethiopica* does not correlate with clinical variations of cutaneous leishmaniasis. *Molecular and biochemical parasitology*. 2000;106(2):239-48.
۱۱. Wheeler RJ, Gluenz E, Gull K. The limits on trypanosomatid morphological diversity. *PLoS One*. 2013;8(11):e79581.
۱۲. Mohammadi S, Parvizi P. Simultaneous Morphological and Molecular Characterization of *Tatera indica* in Southwestern Iran. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*. 2۰۱۶;۱۰(۱):۵۵.
۱۳. Nadim A, Seyedi RM. A brief review of the epidemiology of various types of leishmaniasis in Iran. 1971.
۱۴. Mohebbali M, Javadian E, Yaghoobi Ershadi MR, Akhavan AA, Hajjaran H, Abaei MR. Characterization of *Leishmania* infection in rodents from endemic areas of the Islamic Republic of Iran. 2004.
۱۵. Maraghi S, Zadeh AS, Sarlak AA, Ghasemian M, Vazirianzadeh B. Identification of Cutaneous Leishmaniasis Agents by Nested Po-lymerase Chain Reaction (Nested-PCR) in Shush City, Khuzestan Province, Iran. *Iranian Journal of Parasitology*. 2007;2(3):13-5.
۱۶. Maraghi S, Mardanshah O, Rafiei A, Samarbafzadeh A, Vazirianzadeh B. Identification of cutaneous leishmaniasis agents in four geographical regions of khuzestan province using nested PCR. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2013;6(4).
۱۷. Cupolillo E, Brahim LR, Toaldo CB, de Oliveira-Neto MP, de Brito MEF, Falqueto A, et al. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003;41(7):3126-32.
۱۸. Luyo-Acero GE, Uezato H, Oshiro M, Takei K, Kariya K, Katakura K, et al. Sequence variation of the cytochrome b gene of various human infecting members of the genus *Leishmania* and their phylogeny. *Parasitology*. 2004;128(05):483-91.
۱۹. Parvizi P, Ready PD. Nested PCRs and sequencing of nuclear ITS-rDNA fragments detect three *Leishmania* species of gerbils in sandflies from Iranian foci of zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Tropical Medicine & International Health*. 2008;13(9):1159-71.
۲۰. Jamjoom MB, Ashford RW, Bates PA, Kemp SJ, Noyes HA. Towards a standard battery of microsatellite markers for the analysis of the *Leishmania donovani* complex. *Annals of tropical medicine and parasitology*. 2002;96(3):265-70.
۲۱. World Health O. Basic laboratory methods in medical parasitology: Geneva: World Health Organisation; 1991.
۲۲. Myint CK, Asato Y, Yamamoto Yi, Kato H, Bhutto AM, Soomro FR, et al. Polymorphisms of cytochrome b gene in *Leishmania* parasites and their relation to types of cutaneous leishmaniasis lesions in Pakistan. *The Journal of dermatology*. 2008;35(2):76-85.
۲۳. Shirzadi M. Instruction of Cutaneous Leishmaniasis care (Salak) in Iran. Ministry of Health, Treatment and Medical Education, Deputy of Health, Administration Center of Contagious Diseases, Office of Transmissible Disease between Humans and Animals First Pub, Raze nahan, Tehran [In Persian]. 2012;64.
۲۴. Spotin A, Rouhani S, Ghaemmaghami P, Haghighi A, Zolfaghari MR, Amirkhani A, et al. Different morphologies of *Leishmania major* amastigotes with no molecular diversity in a neglected

- endemic area of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. Iranian biomedical journal. 2015;19(3):149.
- ۲۵ Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniases: a review. Medical and veterinary entomology. 1990;4(1):1-24.
- ۲۶ Walters LL. *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sand fly hosts. Journal of Eukaryotic Microbiology. 1993;40(2):196-206.
- ۲۷ Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. International journal for parasitology. 2007;37(10):1097-106.
- ۲۸ Yatawara L, Le TH, Wickramasinghe S, Agatsuma T. Maxicircle (mitochondrial) genome sequence (partial) of *Leishmania major*: gene content, arrangement and composition compared with *Leishmania tarentolae*. Gene. 2008;424(1):80-6.
- ۲۹ Schönian G, Schnur L, El Fari M, Oskam L, Kolesnikov AA, Sokolowska-Köhler W, et al. Genetic heterogeneity in the species *Leishmania tropica* revealed by different PCR-based methods. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2001;95(2):217-24.
- ۳۰ Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. Science. 2005;309(5733):436-42.
- ۳۱ Bañuls A-L, Hide M, Prugnolle F. *Leishmania* and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. Advances in parasitology. 2007;64:1-458.
- ۳۲ Strelkova MV, Eliseev LN, Ponirovsky EN, Dergacheva TI, Annacharyeva DK, Erokhin PI, et al. Mixed leishmanial infections in *Rhombomys opimus*: a key to the persistence of *Leishmania major* from one transmission season to the next. Annals of tropical medicine and parasitology. 2001;95(8):811-9.
- ۳۳ Shirian S, Oryan A, Hatam GR, Daneshbod Y. Mixed mucosal leishmaniasis infection caused by *Leishmania tropica* and *Leishmania major*. Journal of clinical microbiology. 2012;50(11):3805-8.
- ۳۴ Ravel C, Cortes S, Pratlong F, Morio F, Dedet J-P, Campino L. First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species: *Leishmania infantum* and *Leishmania major*. International Journal for Parasitology. 2006;36(13):1383-8.
- ۳۵ Oryan A, Shirian S, Tabandeh M-R, Hatam G-R, Randau G, Daneshbod Y. Genetic diversity of *Leishmania major* strains isolated from different clinical forms of cutaneous leishmaniasis in southern Iran based on minicircle kDNA. Infection, Genetics and Evolution. 2013;19:226-31.
- ۳۶ McMahon-Pratt D, Alexander J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? Immunological reviews. 2004;201(1):206-24.
- ۳۷ Yakovchuk P, Protozanova E, Frank-Kamenetskii MD. Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix. Nucleic acids research. 2006;34(2):564-74.
- ۳۸ Convit J, Ulrich M, Pérez M, Hung J, Castillo J, Rojas H, et al. Atypical cutaneous leishmaniasis in Central America :possible interaction between infectious and environmental elements. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2005;99(1):13-7.
- ۳۹ Manzur A, Butt UA. Atypical cutaneous leishmaniasis resembling eczema on the foot. Dermatology online journal. 2006;12(3).
- ۴۰ Motta ACF, Arruda D, Souza CS, Foss NT. Disseminated mucocutaneous leishmaniasis resulting from chronic use of corticosteroid. International journal of dermatology. 2003;42(9):703-6.

- .۴۱ Puig L, Pradinaud R. *Leishmania* and HIV co-infection: dermatological manifestations. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. 2003;97(sup1):107-14.
- .۴۲ Saki J, Khademvatan S. A molecular study on cutaneous leishmaniasis lesions in Khuzestan province (South west of Iran). *Jundishapur J Microbiol*. 2011;4(4):283-8.
- .۴۳ Saki J, Meamar AR, Oormazdi H, Akhlaghi L, Maraghi S, Mohebbali M, et al. Mini-exon genotyping of *leishmania* species in khuzestan province, southwest iran. *Iranian journal of parasitology*. 2010;5(1):23-34.
- .۴۴ Motazedian H, Noamanpoor B, Ardehali S. Characterization of *Leishmania* parasites isolated from provinces of the Islamic Republic of Iran. 2002.
- .۴۵ Hajjarian H, Mohebbali M, Mamishi S, Vasigheh F, Oshaghi MA, Naddaf SR, et al. Molecular identification and polymorphism determination of cutaneous and visceral leishmaniasis agents isolated from human and animal hosts in Iran. *BioMed research international*. 2013;2013.
- .۴۶ Spotin A, Rouhani S, Parvizi P. The associations of *Leishmania major* and *Leishmania tropica* aspects by focusing their morphological and molecular features on clinical appearances in Khuzestan province, Iran. *BioMed research international*. 2014 Sep 16; 2014.