

Epidemiological Study of Cutaneous Leishmaniasis and Identification of Etiological Species

Abdolmajid Fata¹,
Elham Moghaddas²,
Abdolrahim Rezee³,
Atyeh Abdali⁴,
Lida Jarahi⁵,
Seyed Aliakbar Shamsian⁶

¹ Professor, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

² Assistant Professor, Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

³ Professor, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

⁴ MSc Student in Parasitology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

⁵ Associate Professor, Department of Community Medicine, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

⁶ Associate Professor, Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

(Received July 11, 2017 Accepted September 11, 2017)

Abstract

Background and purpose: Cutaneous leishmaniasis is endemic parasitic disease in different regions of the world especially in Iran. Khorasan province is endemic for anthroponotic and zoonotic cutaneous leishmaniasis with unequal outbreak. Identification of species could have important implications for the disease and reservoirs control and finding the epidemiologic map. There is no study on this protozoa disease in Fariman, northeast Iran. The aim of this study was to determine the protozoa genotyping in this area.

Materials and methods: A cross-sectional study was done in 50 suspected cases in Fariman 2015-2016. After light microscope checking, scrapings from all smears were done for DNA extraction and species identification was done using kDNA- PCR.

Results: Among 50 suspected cases, 40 patients (80%) were found positive with direct smears and 42 (84%) were identified by PCR. *Leishmania tropica* was identified in 13 (31%) and 29 (69%) were infected with *Leishmania major*. Two negative smears were positive with PCR. The disease mainly involved those aged 11-20 years (28.6%) and the most common site of lesions was hands (38.1%) as ulcerative form (58%). From 13 cases of *Leishmania tropica* 75% and 25% were in urban and rural districts, respectively. Also, from 29 cases of *Leishmania major* 17.2% and 82.8% were in urban and rural districts, respectively. This difference was statistically significant ($P=0.004$).

Conclusion: Fariman is a zoonotic leishmaniasis foci in northeast Iran. Further studies on disease reservoirs and vectors seems necessary to control and reduce the number of people affected.

Keywords: Khorasan, *Leishmania major*, *Leishmania tropica*, PCR, Fariman

بررسی اپیدمیولوژیک لیشمانیوز پوستی و تعیین گونه های عوامل ایجاد کننده آن

عبدالمجید فتی^۱
الهام مقدس^۲
عبدالرحیم رضایی^۳
آتیه ابدالی^۴
لیدا جراحی^۵
سیدعلی اکبر شمسیان^۶

چکیده

سابقه و هدف: لیشمانیوز پوستی در مناطق مختلفی از جهان به خصوص ایران اندمیک است. از مناطق مختلف استان خراسان کانون های لیشمانیازیس ژنوتیپیک و اترپونوتیک با شیوع متفاوت گزارش شده است. تا کنون هیچ مطالعه ای در شهرستان فریمان روی گونه های این انگل انجام نشده است، این مطالعه با هدف بررسی ژنوتایپینگ انگل در این منطقه انجام شده است.

مواد و روش ها: این مطالعه توصیفی - مقطعی روی ۵۰ فرد مشکوک به لیشمانیوز پوستی در شهرستان فریمان طی سال های ۱۳۹۴ تا ۱۳۹۵ صورت گرفت. بعد از رنگ آمیزی و مشاهده میکروسکوپی سطح تمامی لام ها جهت استخراج DNA تراشیده شد و به روش Polymerase chain reaction (PCR) تعیین گونه انجام گرفت.

یافته ها: از ۵۰ فرد مشکوک به بیماری لیشمانیوز، ۴۰ نفر (۸۰ درصد) به صورت مشاهدات میکروسکوپی و ۴۲ نفر (۸۴ درصد) به روش مولکولی آلوده به انگل لیشمانیا تشخیص داده شدند که ۱۳ مورد (۳۱ درصد) به لیشمانیا تروپیکا و ۲۹ مورد (۶۹ درصد) به لیشمانیا ماژور مبتلا بودند. دو لام منفی از نظر میکروسکوپی با روش PCR مثبت نشان داده شدند. بیشترین سن افراد مبتلا بین ۱۱ تا ۲۰ سال با فراوانی ۲۸/۶ درصد بود و بیشترین محل زخم های لیشمانیایی در دست (۳۸/۱ درصد) و به شکل اولسراتیو (۵۸ درصد) قرار داشت. از ۱۳ بیمار لیشمانیا تروپیکا ۷۵ درصد و ۲۵ درصد به ترتیب در شهر و روستا زندگی می کردند. هم چنین از ۲۹ بیمار مبتلا به لیشمانیا ماژور ۱۷/۲ و ۸۲/۸ درصد به ترتیب در شهر و روستا بودند ($p=0/004$).

استنتاج: شهرستان فریمان به عنوان یک کانون لیشمانیازیس ژنوتیپیک با گونه غالب لیشمانیا ماژور می باشد. مطالعه بیش تر روی ناقلین و مخازن بیماری جهت کنترل و و یافتن راه هایی جهت کاهش تعداد مبتلایان ضروری به نظر می رسد.

واژه های کلیدی: خراسان، لیشمانیا ماژور، لیشمانیا تروپیکا، PCR، فریمان

مقدمه

دنیای ۱ تا ۱٫۵ میلیون تخمین زده می شود. ایران یکی از ۱۰ کشور جهان است که بیشترین موارد بیماری لیشمانیوز پوستی در آن گزارش می گردد (۱). بیماری

بیماری لیشمانیوز پوستی در ۹۸ کشور جهان اندمیک است. در حال حاضر ۱۲ میلیون نفر در دنیا از این بیماری رنج می برند. میزان بروز سالانه بیماری در

Email: Shamsianaa@mums.ac.ir

مؤلف مسئول: سید علی اکبر شمسیان - مشهد - دانشکده پزشکی - گروه انگل شناسی

۱. استاد، گروه انگل شناسی و فارح شناسی، دانشکده ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
 ۲. استادیار، گروه انگل شناسی و فارح شناسی، دانشکده ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
 ۳. استاد، گروه ایمنی شناسی، دانشکده ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
 ۴. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه انگل شناسی و فارح شناسی، دانشکده ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
 ۵. دانشیار، گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
 ۶. دانشیار، گروه انگل شناسی و فارح شناسی، دانشکده ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
- © تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۴/۲۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۶/۵/۳۱ تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۶/۲۰

به لیشمانیوز پوستی در شهرستان فریمان طی سال‌های ۱۳۹۴ تا ۱۳۹۵ صورت گرفت. از افرادی که مشکوک به زخم لیشمانیازیس جلدی بودند و توسط پزشک به مراکز درمانی سطح شهر ارجاع داده شدند، پس از گرفتن رضایت نامه و پر کردن پرسشنامه نمونه برداری انجام شد. نمونه برداری به وسیله بیستوری و با برداشتن بافت از زیر زخم‌ها انجام شد به صورتی که تا حد امکان در نمونه‌ها خون وارد نگردد.

روش میکروسکوپی

لام‌ها پس از رنگ آمیزی به روش گیمسا مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفتند و موارد مثبت بر اساس مشاهده آماستیگوت‌های انگل در داخل یا خارج از ماکروفاز ثبت گردید. برای استخراج DNA از لام‌های رنگ آمیزی شده استفاده شد.

استخراج DNA و انجام PCR: برای استخراج DNA از کیت اختصاصی GENET BIO استفاده شد. تمام مراحل بر اساس دستورالعمل کیت انجام گردید. به منظور کنترل فرآیند و تعیین غلظت DNA استخراج شده از روش اسپکتروفتومتری (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific) استفاده شد. برای انجام PCR از دو پرایمر با توالی (5'TCGCAGAACGCCCTACC3') و (5'AGGGTTGGTGTAATAAGG3') استفاده گردید که توسط شرکت طوبی نگین ساخته شدند (۵). تکثیر DNA به وسیله ترموسایکلر (ASTEPC-PC818, Japan) با شرایط ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۵ دقیقه و به دنبال آن ۳۸ چرخه شامل Denaturation در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و Annealing در ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه و Extension در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه و در نهایت Final extension در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه انجام گرفت. حجم کلی PCR ۲۵ میکرولیتر بود که شامل ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده بود. دو نمونه استاندارد لیشمانیا ماژور

در شرق، مرکز و جنوب ایران بالاترین میزان بروز را دارد. در حالی که در غرب کشور کم‌ترین میزان را دارد. لیشمانیازیس پوستی یک عفونت انگلی پوستی است که توسط گونه‌های مختلف انگل‌های جنس لیشمانیا ایجاد می‌شود. بیماری توسط گونه‌های خاصی از پشه‌های فلو تومینه منتقل می‌گردد. چونندگان و انسان می‌توانند از مخازن این لیشمانیازیس پوستی باشند (۲). عامل بیماری لیشمانیازیس انگل‌های تک یاخته داخل سلولی از خانواده تریپانوزومیده و جنس لیشمانیا است که به شکل پروماستیگوت موجود در بزاق پشه خاکی ماده می‌باشد که در هنگام خون‌خواری و با تلقیح این شکل از انگل به پوست میزبان باعث بیماری می‌شود. ضایعات از نظر بالینی به دو صورت خشک یا شهری و مرطوب یا روستایی شناخته می‌شوند که عامل لیشمانیوز پوستی روستایی در ایران، لیشمانیا ماژور و عامل شهری لیشمانیا تروپیکا می‌باشد (۳). برای تشخیص بیماری، روش‌های مختلفی مورد استفاده قرار می‌گیرد که در این میان گسترش مستقیم، کشت تک یاخته و روش‌های مولکولی از مهم‌ترین روش‌های تشخیصی هستند. در دو دهه اخیر، سیمای اپیدمیولوژیک لیشمانیوز پوستی در ایران ناشی از جابه‌جایی جمعیت بین مناطق شهری و روستایی و نیز هجوم پناهندگان کشورهای همسایه نظیر افغانستان و عراق به ایران، دچار تغییر و تحول شده است (۴). بنابراین برای کنترل و پیشگیری از این بیماری، داشتن اطلاعات کافی از وضعیت اخیر بیماری، به خصوص تعیین گونه‌های بیماری در هر یک از مناطق کشور ضروری می‌باشد. داشتن نقشه اپیدمیولوژی لیشمانیازیس در استان خراسان با توجه به بروز بالای بیماری جهت طراحی یک برنامه کارآمد برای پیشگیری و مبارزه با مخازن در مناطق مختلف ضروری است. این مطالعه با هدف بررسی اپیدمیولوژی لیشمانیوز پوستی در شهرستان فریمان انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه توصیفی - مقطعی روی ۵۰ فرد مشکوک

لیشمانیا تروپیکا (Strain MRHO/IR/75/ER)

به عنوان شاهد مثبت و آب مقطر به عنوان شاهد منفی آزمایش استفاده شدند. محصولات به دست آمده از PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بارگزاری شدند و نتایج با اشعه Ultraviolet (UV) بررسی شد. نتایج نهایی به وسیله نرم افزار SPSS نسخه ۱۱ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

یافته ها

در این مطالعه ۵۰ بیمار مشکوک به لیشمانیازیس پوستی با انجام روش KDNA-PCR مورد بررسی قرار گرفتند. تکثیر DNA الگوی انگل لیشمانیا با پرایمرهای استفاده شده در این آزمایش به صورتی است که انگل لیشمانیا ماژور ۶۲۰ bp و لیشمانیا تروپیکا باند ۸۳۰ bp را تشکیل می دهد.

از تعداد ۵۰ مراجعه کننده با تکنیک ملکولی ۴۲ نفر (۸۴ درصد) از آن ها به لیشمانیا مبتلا بودند که ۱۳ مورد (۳۱ درصد) به لیشمانیا تروپیکا و ۲۹ مورد (۶۹ درصد) به لیشمانیا ماژور مبتلا بودند (جدول شماره ۱). دو لام منفی با تکنیک رنگ آمیزی و مشاهده میکروسکوپی در روش ملکولی مثبت بودند.

از ۲۹ فرد مبتلا به لیشمانیا ماژور ۲۴ نفر (۸۲/۸ درصد) در مناطق روستایی و ۵ نفر (۱۷/۲ درصد) در مناطق شهری زندگی می کردند. از تعداد ۱۳ فرد مبتلا به لیشمانیا تروپیکا ۱۰ نفر (۷۵ درصد) در مناطق شهری و ۳ نفر (۲۵ درصد) در مناطق روستایی زندگی می کردند که از لحاظ آماری تفاوت معنی داری میان افراد مبتلا به لیشمانیا ماژور در مناطق شهری و روستایی وجود دارد ($p=0.004$). (از کل افراد مبتلا به این بیماری ۵۴/۸ درصد را مردان و ۴۵/۲ درصد را زنان تشکیل می دهند. بیشترین سن درگیر با بیماری در افراد ۱۱ تا ۲۰ سال با فراوانی ۲۸/۶ درصد بود (جدول شماره ۱).

در این مطالعه از مجموع افراد مبتلا به لیشمانیازیس ۲۷ بیمار (۶۴/۳ درصد) دارای یک زخم و ۱۵ بیمار (۳۵/۷ درصد) دارای بیش تر از یک زخم بودند. بین محل سکونت ($p=0.04$) و نوع ساختمان مسکونی ($p=0.09$) با شیوع بیماری رابطه معنی داری وجود نداشت. هم چنین مشخص شد که بیشترین موارد ابتلا به بیماری در فصل تابستان با ۵۴/۸ درصد در شهریور ماه بود (جدول شماره ۱). بیشترین رخداد زخم های ناشی از لیشمانیا در ناحیه دست بود که تفاوت معنی داری بین اندام مبتلا و گونه لیشمانیا وجود نداشت

جدول شماره ۱: شاخص های دموگرافیک بیماران مبتلا به لیشمانیازیس پوستی و نتایج تست آماری در شهرستان فریمان، سال ۱۳۹۴-۹۵

شاخص	تعداد بیماران (درصد)	سطح معنی داری
گونه		
لیشمانیا تروپیکا	۳۱ (۱۳)	
لیشمانیا ماژور	۶۹ (۲۹)	$p \geq 0.05$
سن		
۱-۱۰	۷ (۱۳)	
۱۱-۲۰	۲۸ (۶۱)	
۲۱-۳۰	۲۱ (۴۹)	
۳۱-۴۰	۲۱ (۴۹)	
۴۱-۵۰	۱۴ (۳۱)	
۵۱-۵۹	۷ (۱۳)	$p \geq 0.05$
جنس		
مذکر	۵۴ (۸۲)	
مونث	۴۵ (۲۱)	$p \geq 0.05$
فصل		
بهار	۱۶ (۷)	
تابستان	۵۴ (۸۲)	
پاییز	۲۳ (۸)	
زمستان	۴ (۸)	$p \leq 0.05$
سابقه مسافرت		
دارد	۵۹ (۵۲)	
ندارد	۴ (۵)	$p \geq 0.05$
نوع ساختمان مسکونی		
قدیمی	۴۵ (۲۱)	
نوساز	۵۴ (۸۲)	$p \leq 0.05$
تعداد زخم		
یک	۶۴ (۳۱)	
دو	۲۱ (۴۹)	
بیش تر از دو	۱۴ (۳۱)	$p \geq 0.05$
عضو درگیر		
دست	۳۸ (۱۱)	
پا	۲۸ (۶)	
صورت	۳۳ (۳)	$p \leq 0.05$
شکل زخم		
تندول	۲ (۴)	
پاپول	۲۱ (۴۹)	
اولسر	۵۸ (۲۹)	
اشکال میکس	۷ (۱۳)	$p \geq 0.05$
شغل		
مغازه دار	۴ (۸)	
کشاورز	۱ (۹)	
کارگر	۱۱ (۹)	
محصل	۲۳ (۸)	
خانه دار	۲۳ (۸)	
کارمند	۷ (۱۳)	
راننده	۴ (۸)	
بیکار	۴ (۸)	

بر اساس اشکال بالینی مختلف (ندول، پاپول، اولسر، اشکال میکس) بیشترین نمای مشاهده شده در بیماران مبتلا با فراوانی ۵۸ درصد به شکل اولسر بود.

بحث

بررسی‌ها نشان می‌دهد که لیشمانیازیس در جهان از جمله ایران رو به افزایش است (۶). شناسایی جنبه‌های اپیدمیولوژیک بیماری لیشمانیوز پوستی جهت ارائه برنامه کنترل و درمان ضرورت دارد. مدیریت بیماری در مناطق بومی در جهت پیش‌گیری از گسترش بیماری و درمان حائز اهمیت است. به همین دلیل شناسایی گونه انگل اهمیت بالایی دارد چرا که مشخص کننده نوع بیماری و چگونگی ظهور علائم کلینیکی و نحوه درمان در یک منطقه خواهد بود. مطالعه روی لیشمانیازیس از سال ۱۹۵۳ در شمال شرقی ایران در منطقه ترکمن صحرا (شرق استان گلستان) و لطف آباد شروع شد (۷). با توجه به مطالعات گسترده‌ای که در اکثر نقاط ایران روی عامل لیشمانیازیس پوستی در انسان انجام گرفته است، لیشمانیا ماژور و تروپیکا با میزان شیوع متفاوت گزارش شده است. مطابق مطالعات پیشین در خراسان، هر دو فرم خشک و مرطوب گزارش شده‌اند که فرم خشک در شهرهای مشهد (۸) اطراف نیشابور (۹) خواف (۱۰) تربت جام (۱۱) و تربت حیدریه (۱۲) و فرم مرطوب در شهرهای سرخس، لطف آباد و اسفراین دیده شده است (۱۳). مسافرت و جابه‌جایی افراد مبتلا در طول زمان باعث تغییرات اپیدمیولوژیکی و یا ایجاد یک کانون جدید در برخی قسمت‌های ایران می‌شود، به عنوان مثال یک کانون لیشمانیازیس زئوتتیک در پاکدشت تهران بر اثر سفر کاری افراد به شهرستان سبزوار (کانون لیشمانیا ماژور) به وجود آمده است (۱۴).

در مطالعه دیگری در شهرستان خواف استان خراسان ۲۰ از ۱۲۰ بیماری که مبتلا به لیشمانیا ماژور

بودند سابقه مسافرت به کانون‌های لیشمانیازیس زئوتتیک از جمله گنبد کاووس استان گلستان (به عنوان کانون اندمیک نوع مرطوب لیشمانیازیس) را داشتند (۱۵، ۱۰). در مطالعه حاضر تعداد مردان مبتلا به لیشمانیازیس بیش‌تر از زنان بود اما این تفاوت از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($p=0/004$). این یافته با نتایج تحقیقات انجام شده در مطالعه فتی و همکاران در درگز (۱۶)، سعدآبادی و همکاران در نیشابور (۹)، ناصری و همکاران در تربت حیدریه (۱۲)، الهی و همکاران در مشهد (۱۷)، رفعتی و همکاران در دامغان (۱۸) مطابقت دارد (۱۰). این امر نشان می‌دهد که همه افراد مواجهه یکسانی در برابر گزش پشه خاکی داشتند. ابتلای بیش‌تر مردان مربوط به نوع پوشش و کار در خارج از منزل و رفت و آمد به مناطق بیابانی و بیرون ماندن از منزل بعد از غروب آفتاب می‌باشد. طبق نتایج به دست آمده از این مطالعه دامنه سنی افراد مبتلا به بیماری لیشمانیازیس از ۶ سال تا ۵۶ سال متغیر است اما در گروه سنی ۱۰ تا ۱۹ سال بیش‌ترین میزان شیوع وجود دارد که با مطالعه فاضلی و همکاران مطابقت دارد (۲۰، ۱۹). افراد در این گروه سنی زمان بیش‌تری بیرون از خانه به سر می‌برند و در معرض نیش پشه‌های خاکی هستند. بنابراین به مراکز درمانی این شهرستان می‌توان توصیه‌هایی مبنی بر پوشیدن لباس‌های بلند و آستین‌دار و عدم خوابیدن در حیاط منزل یا استفاده از پشه بند به خصوص در فصل شیوع بیماری نمود. با این که زخم‌های سالک در افراد مبتلا به لیشمانیازیس جلدی ممکن است در اندام‌های مختلف بدن مشاهده گردد، اما در مطالعه حاضر بیش‌ترین اندام مبتلا در ناحیه دست و کم‌ترین ضایعات در ناحیه تنه مشاهده گردید. این نتایج با مطالعات فتی و همکاران در درگز (۱۶)، فضایی و همکاران در میرجاوه (۱۹)، شریفی و همکاران در بم (۲۱) مطابقت داشت.

به طور کلی ضایعات پوستی سالک معمولاً در نقاط باز بدن و جاهایی که بیش تر در معرض گزش پشه خاکی است مانند صورت و دست و پا به وجود می آیند به خصوص که پشه های خاکی به خاطر دارا بودن ضمایم دهانی کوتاه، قادر به خون خواری از نواحی پوشیده بدن نیستند. ضایعات در نوع شهری غالباً روی صورت و در نوع روستایی بیش تر روی دست و پا ظاهر می شوند (۲۲، ۲۳). در این مطالعه ۶۴/۳ درصد بیماران ساکن مناطق روستایی فریمان بودند که ۸۸/۹ درصد آن ها مبتلا به لیشمانیا ماژور بودند. رابطه معنی داری بین محل سکونت و گونه انگل وجود داشت ($p=0/004$). که با سایر مطالعات هم خوانی دارد. از علل این امر می توان به وجود اماکن قدیمی در مناطق روستایی، شغل افراد و عدم درمان به موقع بیماری اشاره نمود. هم چنین بافت قدیمی و خانه های مخروبه، دلیلی بر افزایش ابتلا به بیماری است. در این مطالعه ارتباط بین ابتلا به بیماری و نوع ساختمان مسکونی از لحاظ آماری معنی داری نبود ($p=0/4$). هم چنین روند زمانی بیماری بر اساس ماه های سال نشان داد که موارد بیماری در فصل تابستان افزایش داشته، بیش ترین موارد مربوط به شهریور ماه کم ترین موارد مربوط به فروردین ماه و بهمن ماه بود. در اغلب مطالعات بیش ترین فصل آلودگی به بیماری پاییز می باشد (۱۱، ۱۵) که با نتیجه حاصل از این مطالعه تفاوت دارد. شهرستان فریمان در نزدیکی مرز خراسان با افغانستان و دارای آب و هوایی گرم می باشد که احتمالاً فعالیت زود هنگام پشه ها در اواخر زمستان را باعث می شود و این امر بروز آن را در ماه آخر تابستان توجیه می کند. روش های متعددی در تشخیص قطعی لیشمانیازیس به کار می رود که روش میکروسکوپی به عنوان روش استاندارد در اغلب مطالعات و به تازگی در مطالعات جدید روش PCR معرفی شده است (۲۴، ۲۵). (۱۰، در بسیاری از مطالعاتی که روی نمونه های

مشکوک به لیشمانیازیس جلدی صورت گرفته است روش PCR دارای حساسیت بیش تری از روش میکروسکوپی معرفی شده است که این امر می تواند به دلیل تعداد کم انگل در ضایعه، مهارت نداشتن تکنسین در تشخیص و یا عفونی شدن زخم اتفاق بیفتد. در برخی مطالعات بیش از ۵۰ درصد نمونه هایی که با اسمیر مستقیم منفی شده اند در PCR مثبت نشان داده شدند (۲۸، ۲۶). به عنوان نتیجه گیری نهایی می توان گفت که استفاده از روش PCR در تعیین گونه های انگل های عامل لیشمانیازیس جلدی در این تحقیق موفقیت آمیز بود. این روش به نسبت آسان و از قابلیت پردازش تعداد زیادی نمونه در مدت زمان کم برخوردار است و در مقایسه با روش معمولی میکروسکوپی، می تواند به عنوان یک ابزار، نه تنها برای دستیابی به میزان شیوع و بروز عفونت لیشمانیا و درمان و کنترل مفید باشد، بلکه برای شناسایی سریع گونه های رایج در مناطق اندمیک نیز مورد استفاده قرار گیرد (۲۱). جنس های مختلف لیشمانیا جزء خانواده تریپانوزوماتیده و رده کیتوپلاستیده است. KDNA-PCR روشی ملکولی با پرایمرهای اختصاصی طراحی شده روی DNA قسمت کیتو پلاست است که بسیار اختصاصی عمل می کند (۱۰).

نتیجه مطالعه، حاکی از موجود بودن هر دو فرم لیشمانیوز پوستی آنتروپونوتیک و زئونوتیک (شکل غالب) در شهرستان فریمان می باشد. این نقشه اپیدمیولوژی می تواند ناشی از ساخت و سازهای بی رویه در شهرها و روستاها، انباشته شدن نخاله های ساختمانی و زباله ها در نزدیکی مسکن که باعث رشد مخازن در نوع لیشمانیا ماژور و افزایش ناقلین هر دو گونه، کشاورزی در محل سکونت که زمینه رشد مخازن و ناقلین انگل را مهیا می کند، شیوه زندگی افراد و تغییرات اکولوژیکی باشد. از نتایج به دست آمده از این مطالعه می توان جهت

این مقاله برگرفته از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد به شماره طرح پژوهشی ۹۳۰۷۷۹ می باشد. این مطالعه با حمایت معاونین محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، سازمان جهاد دانشگاهی مشهد و مراکز درمانی شهرستان فریمان انجام شده است. بدین وسیله از تمامی کمک‌های مادی و معنوی این مراکز در طول اجرای طرح قدردانی و تشکر می‌شود.

طراحی یک برنامه جامع مبارزه با لیشمانیازیس زئونوتیک جلدی در شهرستان فریمان و روستاهای تابعه آن استفاده کرد.

سپاسگزاری

References

- Alvar J, Vélez 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.
- Yaghoobi-Ershadi MR, Hanafi-Bojd AA, Javadian E, Jafari R, Zahraei-Ramazani AR, Mohebbali M. A new focus of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica*. *Saudi Med J*. 2002; 23(3): 291-294.
- Molyneux DH, Ashford RW. The biology of *Trypanosoma* and *Leishmania*, parasites of man and domestic animals. UK: London ; Taylor & Francis Ltd.1983.
- Mohajery M, Shamsian A, Javaheri A. Isolation of *Leishmania major* by isoenzyme electrophoresis method in Mashhad. *Med J Mashhad Univ Med Sci*. 2004; 48(2): 19-27.(persian)
- Mahboudi F, Abolhassani M, Yaran M, Mobtaker H, Azizi M. Identification and Differentiation of Iranian *Leishmania* Species by PCR Amplification of kDNA. *Scand J Infect Dis*. 2001; 33(8): 596-598.
- Oshaghi MA, Rasolian M, Shirzadi MR, Mohtarami F, Doosti S. First report on isolation of *Leishmania tropica* from sandflies of a classical urban Cutaneous leishmaniasis focus in southern Iran. *Exp Parasitol*. 2010; 126(4): 445-450.
- Baghaei A, Parvizi P, Amirkhani A, Honarvar M, Badiei F. Identification of *Leishmania* using microscopic and molecular methods in suspected patients of Cutaneous Leishmaniasis by targeting ITS-rDNA gene, Golestan province, Iran (2009-10). *J Gorgan Univ Med Sci*. 2012; 14(3): 72-81.(persian)
- Shirazi MK, Razmi GR, Naghibi A. Molecular Identification of *Leishmania* Species Causing Cutaneous Leishmaniasis in Mashhad, Iran. *Birjand Univ Med Sci*. 2014; 21(2): 237-245. (persian)
- Saadabadi F, Mohajery M, Poostchi E, Shamsian SAA. Identification of *Leishmania* species causing cutaneous leishmaniasis using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR) in Kharve, Iran. *Rep Biochem Mol Biol*. 2013; 1(2): 69-73.
- Abdolmajid F, Ghodrattollah SS, Hushang R, Mojtaba MB, Ali MM, Abdolghayoum M. Identification of *Leishmania* species by kinetoplast

- DNA-polymerase chain reaction for the first time in Khaf district, Khorasan-e-Razavi province, Iran. *Trop Parasitol.* 2015; 5(1): 50-54.
11. Pagheh AS, Fakhar M, Sharif M, Danesh V, Ahmadi Z. Epidemiological Survey of Cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania tropica* in a New Focus in Khorasan Razavi Province. *J Mazandaran Univ Med Sci.* 2013; 23(103): 47-53.(persian)
 12. Naseri A, Fata A, Rezai A, Hedayatimoghadam M, Berengi F, Akbarzadeh O, et al. Molecular identification of *Leishmania* species in Torbat-e Heydarieh, Khorasan Razavi province, Iran. *Int J Med Res Health Sci.* 2016; 5(6): 87-92.(persian)
 13. Bakhshi H, Oshaghi MA, Abai MR, Rassi Y, Akhavan AA, Sheikh Z, et al. Molecular detection of *Leishmania* infection in sand flies in border line of Iran-Turkmenistan: Restricted and permissive vectors. *Exp Parasitol.* 2013; 135(2): 382-387.
 14. Pazoki Ghohe H, Pagheh AS, Fakhar M, Tavakoli G, Nazar E, Kiani M. Molecular Identification of *Leishmania* Species Isolated from Patients with Cutaneous Leishmaniasis in Pakdasht District, Iran, 2009-2014. *J Mazandaran Univ Med Sci.* 2016, 15; 26(143): 241-246.(persian)
 15. Pagheh AS, Fakhar M, Mesgarian F, Rahimi-esboei B, Badiee F. Incidence Trend of Rural Cutaneous Leishmaniasis in Gonbad-e- Qabus City, (Golestan, Iran) during 2009-2012. *J Mazandaran Univ Med Sci.* 2013; 23(104): 1- 8.
 16. Fata A, Moghaddas E, Mousavi-Vafa F, Shamsian SA, Rezai A. Identification of cutaneous leishmaniasis species in the Dargaz city, Iran. *J Isfahan Med Sch.* 2017; 34(413); 158: 1589-1592.(persian)
 17. Elahi R, Fata A, Berengi F. Comparing different leishmaniasis laboratory detecting methods. *Mashhad J Med Sci.* 1995; 47(38): 68-72.(persian)
 18. Rafati N, Shaporimoghadem A, Ghorbani R. Epidemiological study of cutaneous Leishmaniasis in Damghan (2000-2006). *Koomesh.* 2007; 8(4): 247-254.(persian)
 19. Fazaeli A, Fouladi B, Sharifi I. Emergence of cutaneous leishmaniasis in a border area at south-east of Iran: an epidemiological survey. *J Vector Borne Dis.* 2009; 46(1): 36-42.
 20. Gurel MS, Ulukanligil M, Ozbilge H. Cutaneous leishmaniasis in Sanliurfa: epidemiologic and clinical features of the last four years (1997-2000). *Int J Dermatol.* 2002; 41(1): 32-37.
 21. Sharifi I, Fekri AR, Aflatonian MR, Nadim A, Nikian Y, Kamesipour A. Cutaneous leishmaniasis in primary school children in the south-eastern Iranian city of Bam, 1994-95. *Bull World Health Organ.* 1998; 76(3): 289-293.
 22. Mesgarian F, Rahbarian N, Hajaran H, Shahbaz F, Mesgarian Z, Taghipour N. Identification of *Leishmania* species isolated from human cutaneous Leishmaniasis in Gonbad-e-Qabus city using a PCR method during 2006-2007. *Tehran Univ Med Sci.* 2010; 65(4): 250-256.(persian)

23. Fakhar M, Mikaeili F, Hatam G, Habibi P, Karamian M, Motazedian M, et al. A molecular epidemiology survey of cutaneous leishmaniasis in patients referring to Parasitology Lab at Shiraz School of Medicine and the importance of PCR assay. *J Pars Univ Med Sci.* 2010; 8(1): 2-6.(persian)
24. Fata A, Dalimi Asl H, Jaefari MR, Mohajeri M, Khamesipour A, Valizadeh M. Clinical appearance, Leishmanian test & ELISA using monoclonal antibody in diagnosis of different form of cutaneous Leishmaniasis. *J Mashhad Univ Med Sci.* 2004; 47(83): 19- 27.(persian)
25. Shirangi E, Maaleki F, Afzal Aghae M, Fati S, Ghaffarian M, Meshkat M, et al. Correlation between the result of Leishmanin skin test and clinical forms of cutaneous leishmaniasis and soecies of parasite. *J Mashad Univ Med Sci .* 2010; 53 (3):145-151.(persian)
26. Kato H, Uezato H, Katakura K, Calvopiña M, Marco JD, Barroso PA, et al. Detection and identification of Leishmania species within naturally infected sand flies in the Andean areas of Ecuador by a polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 2005; 72(1): 87-93.
27. Pagheh AS, Fakhar M, Mesgarian F, Gholami S, Badiiee F. Detection and Identification of Causative Agent of Cutaneous Leishmaniasis Using Specific PCR. *J Mazandaran Uni Med Sci.* 2012; 21(1): 85-92.(persian)
28. Kazemi-Rad E, Mohebbali M, Hajjaran H, Rezaei S, Mamishi S. Diagnosis and characterization of Leishmania species in Giemsa-stained slides by PCR-RFLP. *Iran J Public Health.* 2008; 37(1): 54-60.(persian)