

شناسایی گونه‌های عامل Leishmaniasis پوستی در شهرستان درگز

عبدالمجید فتی^۱، سید عبدالرحیم رضایی^۲، الهام مقدس^۳، فائزه‌سادات موسوی وفا^۴، سید علی‌اکبر شمسینان^۵

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: Leishmaniasis پوستی، از بیماری‌های انگلی پوستی است که در بسیاری مناطق جهان به ویژه ایران به صورت اندمیک وجود دارد. هر چند روش میکروسکوپی روش متداول تشخیص بیماری می‌باشد، اما تشخیص گونه‌های عامل Leishmaniasis به صورت میکروسکوپی و یا از طریق یافته‌های بالینی امکان پذیر نیست. برای این منظور، روش‌های مولکولی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند.

روش‌ها: در این مطالعه، شناسایی گونه‌ی عامل Leishmaniasis پوستی در شهرستان درگز به روش Polymerase chain reaction (PCR) با هدف قرار دادن ژن کیتوپلاست Kinetoplast-DNA (kDNA) مورد بررسی قرار گرفت. این مطالعه بر روی ۹۴ نمونه‌ی گرفته شده از بیماران مشکوک به Leishmaniasis مراجعه کننده به مراکز درمانی شهرستان درگز انجام شد. لام‌ها به روش گیمسا (Gimsa) رنگ‌آمیزی شدند و مورد بررسی مستقیم قرار گرفتند. PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی DNA کیتوپلاست انجام شد و نتایج به دست آمده، توسط نرم‌افزار آماری SPSS و آزمون χ^2 تجزیه و تحلیل گردید.

یافته‌ها: در بین ۹۴ مراجعه کننده‌ی مشکوک به Leishmania، لام میکروسکوپی ۸۲ نفر (۸۷/۲ درصد) از بیماران و با روش مولکولی ۸۵ نفر (۹۰/۴ درصد) از بیماران مثبت شدند که تعداد ۶۳ مورد (۷۴/۱ درصد) Leishmania major و ۲۲ مورد (۲۵/۹ درصد) Leishmania tropica بودند. با در نظر گرفتن روش kDNA-PCR به عنوان یک روش استاندارد، ویژگی روش مستقیم میکروسکوپی ۱۰۰ درصد و حساسیت آن ۹۶ درصد محاسبه گردید. در این مطالعه، بین ابتلا به بیماری و فصل بروز ($P = ۰/۰۴۵$)، محل سکونت ($P = ۰/۰۰۴$)، جدید یا کهنه بودن ساختمان مسکونی ($P = ۰/۰۰۳$) و همچنین، نزدیکی به محل زندگی چوندگان ($P = ۰/۰۲۵$) رابطه‌ی معنی‌داری وجود داشت. بیشترین رخداد زخم‌های ناشی از Leishmania در نواحی دست و صورت بود.

نتیجه‌گیری: شهرستان درگز به عنوان کانون Zoonotic leishmaniasis مطرح بوده است؛ نتایج این مطالعه نشان می‌دهد کانون‌های جدیدی از Anthroponotic leishmaniasis نیز در این منطقه وجود دارد. Leishmania major عامل غالب بروز Leishmaniasis پوستی در این شهرستان بود ولی Leishmania tropica نیز به مقادیر کمتری در آن وجود داشت.

واژگان کلیدی: Leishmaniasis پوستی، Leishmania major، Leishmania tropica، Polymerase chain reaction، ایران

ارجاع: فتی عبدالمجید، رضایی سید عبدالرحیم، مقدس الهام، موسوی وفا فائزه‌سادات، شمسینان سید علی‌اکبر. شناسایی گونه‌های عامل Leishmaniasis پوستی در شهرستان درگز. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۵؛ ۳۴ (۴۱۳): ۱۵۸۹-۱۵۸۲

مقدمه

Leishmaniasis پوستی، یک بیماری عفونی ناشی از جنس‌های مختلف انگل Leishmania می‌باشد که از طریق نیش پشه‌ی خاکی به انسان منتقل می‌گردد (۱). عامل بیماری Leishmaniasis، انگل‌های تک یاخته‌ی داخل سلولی از خانواده‌ی

Trypanosomatida و جنس Leishmania است که در مرحله‌ی متاسیکلیک پروماستیگوت موجود در بزاق پشه‌ی خاکی ماده می‌باشد که در هنگام خون‌خواری و با تلقیح این شکل از انگل به پوست میزبان، باعث بیماری می‌شود (۵-۲). این بیماری عفونی در اروپا، آفریقا، آسیا و امریکا بسیار رایج

- ۱- استاد، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
- ۲- استاد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
- ۳- استادیار، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
- ۴- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
- ۵- دانشیار، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

Email: shamsiana@mums.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: سید علی‌اکبر شمسینان

این بیماری می‌شود (۱۸).

اشکال Leishmaniasis پوستی دارای علائم مشابهی هستند و تمایز بین گونه‌ها از طریق علائم بالینی و روش‌های میکروسکوپی مرسوم امکان پذیر نیست. در میان روش‌های موجود، روش مولکولی Polymerase chain reaction (PCR) بسیار حساس و سریع برای تشخیص گونه‌ی عامل عفونت‌زا می‌باشد. روش‌های مولکولی در تشخیص Leishmania حساسیت ۱۰ برابر در مقایسه با روش‌های سرولوژیکی دارند.

Kinetoplast-DNA-PCR (kDNA-PCR) روشی بسیار حساسیت ۹۸/۷ درصد در بین روش‌های مولکولی است. جداسازی و شناسایی گونه‌های مختلف Leishmaniasis، برای درمان اختصاصی و همچنین، طراحی یک برنامه‌ی کارآمد برای کنترل و پیش‌گیری بیماری و مبارزه با مخازن در مناطق مختلف حایز اهمیت است (۲۰-۱۹، ۱). شهرستان درگز، یکی از شهرهای شمال شرق ایران است که از شمال به مرز ایران و ترکمنستان محدود می‌باشد. این مطالعه در شهرستان درگز به منظور تکمیل نقشه‌ی اپیدمیولوژی این بیماری در استان خراسان رضوی است که از قبل، مطالعات مشابهی در دیگر شهرهای استان انجام شده است (۱۹-۱۸).

روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: جمعیت مورد مطالعه، افرادی بودند که در بازه‌ی زمانی دی ماه ۱۳۹۳ تا آذر ماه ۱۳۹۴ به دلیل داشتن حداقل یک زخم مشکوک به Leishmaniasis بنا به نظر پزشک برای آزمایش مستقیم به مراکز بهداشتی سطح شهر درگز مراجعه کرده بودند. حجم نمونه با توجه به مطالعات قبلی ۹۴ مورد به دست آمد (۲۱). اطلاعات بالینی و دموگرافیک با استفاده از پرسش‌نامه جمع‌آوری و از بیمار رضایت‌نامه‌ی کتبی دریافت شد. از هر بیمار، دو نمونه از حاشیه‌ی زخم با استفاده از بیستوری تهیه شد. لام‌ها ابتدا به روش گیمسا (Gimsa) رنگ‌آمیزی و با عدسی ۱۰۰ جهت مشاهده‌ی انگل بررسی شدند. سطح تمامی لام‌ها جهت استخراج DNA و انجام PCR تراشیده شد.

استخراج DNA و انجام PCR استخراج DNA با استفاده از کیت استاندارد Ge Net Bio (Korea) و بر اساس دستورالعمل آن، انجام شد. جهت کنترل فرایند و تعیین غلظت DNA استخراج شده، از روش نانو اسپکتروفتومتری (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific) استفاده شد.

پرایمرهای DNA Kinetoplast mini-circle (kDNA) انگل Leishmania، با توالی‌های (5'TCGCAGAACGCCCTACC3') F: و (3' AGGGTTGGTGTAAAATAGG 5') R: توسط شرکت

است و هر سال، باعث مرگ میلیون‌ها نفر می‌شود. Leishmaniasis پوستی، یک مشکل بهداشتی نگران‌کننده برای جهان است که واکنش مؤثری ندارد و داروها اثر محدودی بر آن دارند (۶).

Leishmaniasis، به طور تقریبی در ۹۸ کشور جهان که در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری قرار دارند، اندمیک است و به طور تقریبی ۱۲ میلیون نفر هم‌اکنون در سراسر جهان مبتلا به این بیماری هستند. در حال حاضر، Leishmaniasis جمعیت‌های محروم و فقیر را به ویژه در کشورهای در حال توسعه، تحت تأثیر خود قرار داده است (۹-۷). بیش از ۹۰ درصد موارد Leishmaniasis پوستی، در ۷ کشور جهان شامل افغانستان، نیجریه، برزیل، ایران، پرو، عربستان سعودی و سوریه اتفاق می‌افتد (۱۱-۱۰).

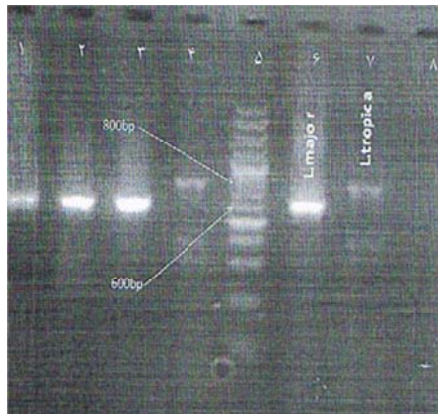
بهبود زخم‌های Leishmaniasis پوستی، ممکن است بدون درمان چند ماه تا چندین سال بسته به گونه‌ی آلوده‌کننده، به طول بینجامد. زخم‌های ناشی از Leishmania major ممکن است در مدت کوتاه درمان شوند، اما ترمیم زخم‌های ناشی از Leishmania tropica ممکن است مدت بیشتری طول بکشد که گاهی به گلوکانتیم هم پاسخ نمی‌دهد و این بدشکلی زخم پوستی، باعث اثرات روحی و روانی در بیمار شود (۱۲).

Zoonotic leishmaniasis پوستی یا فرم روستایی ناشی از Leishmania major، بیشتر در نواحی روستایی گسترش می‌یابد و میزبان عمده‌ی مخزن آن را جوندگان از جمله ژربیل‌ها تشکیل می‌دهند. از طرفی، فرم Anthroponotic leishmaniasis پوستی یا فرم شهری، به وسیله‌ی Leishmania tropica که میزبان عمده‌ی مخزن آن انسان‌ها می‌باشند، ایجاد می‌گردد (۱۴-۱۳، ۸).

Leishmaniasis به طور عمده، یکی از مشکلات سلامت در برخی استان‌های ایران است که سالانه حدود ۲۰ هزار مورد ابتلا به آن از مناطق مختلف ایران گزارش می‌شوند. ۸۰ درصد این تعداد، فرم Zoonotic leishmaniasis پوستی و حدود ۱۹/۵ درصد Anthroponotic leishmaniasis پوستی و درصد باقی مانده متعلق به فرم Leishmaniasis احشایی می‌باشد (۱۶-۱۵).

Leishmaniasis پوستی، به ویژه نوع Zoonotic leishmaniasis پوستی ناشی از Leishmania major معضل جدی بهداشتی و رو به افزایش است که در مناطق شمال شرق ایران، ترکمن صحرا و لطف‌آباد به صورت اندمیک وجود دارد (۱۷).

در مطالعات گذشته، نشان داده شد که با توجه به تغییرات محیطی، نقشه‌ی پراکندگی این بیماری در حال تغییر است، مهاجرت‌های بی‌رویه از مناطق روستایی به شهری، ساخت و سازها، زباله‌های ساختمانی و انسانی و ایجاد محیطی مناسب برای فعالیت پشه‌های ناقل، از عواملی هستند که سبب تغییر در نقشه‌ی پراکندگی



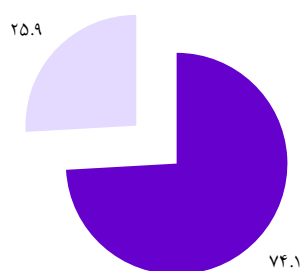
شکل ۱. باندهای ایجاد شده از ۴ نمونه‌ی بیماران مبتلا به

Leishmania major و Leishmania tropica

شماره‌های ۱، ۲ و ۳: Leishmania major، شماره‌ی ۴: Leishmania tropica، شماره‌ی ۵: نشانگر ۱۰۰ bp، شماره‌ی ۶: شاهد مثبت Leishmania major، شماره‌ی ۷: شاهد مثبت Leishmania tropica و شماره‌ی ۸: شاهد منفی.

از تعداد ۶۳ مورد مبتلا به Leishmania major ۳۹ مورد (۶۱/۹ درصد) در مناطق روستایی و ۲۳ مورد (۳۶/۵ درصد) در مناطق شهری و ۱ مورد (۱/۶ درصد) از عشایر چادرنشین بودند. از تعداد ۲۲ مورد مبتلا به Leishmania tropica ۵ بیمار (۲۲/۷ درصد) ساکن مناطق روستایی و ۱۷ بیمار (۷۷/۳ درصد) ساکن مناطق شهری بودند. آزمون χ^2 نشان داد که تعداد بیماران مبتلا به Leishmania major در مناطق روستایی تفاوت معنی‌داری با مناطق شهری داشت ($P = ۰/۰۰۴$).

■ Leishmania major ■ Leishmania tropica



شکل ۲. میزان فراوانی گونه‌های Leishmania در شهرستان درگز در سال‌های ۹۴-۱۳۹۳

از کل موارد بیماران، ۶۹/۴ درصد را مردان و ۳۰/۶ درصد را زنان تشکیل می‌دادند. بیشترین سن درگیر با بیماری در کودکان زیر ۱۰ سال با فراوانی ۳۱/۸ درصد بود (شکل ۳).

طوبی نگین ساخته شدند (۲۲). اساس PCR، استفاده از دماهای مختلف در سه مرحله‌ی واکنش جدا شدن رشته‌های DNA، اتصال پرایمرها به رشته‌های الگو و طولی شدن پرایمرها می‌باشد. تکثیر DNA به وسیله‌ی ترموسایکلر قابل برنامه‌ریزی (ASTEC-PC818, Japan) با شرایط ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه و به دنبال آن ۳۸ چرخه شامل Denaturation در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و Annealing در ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و Extension در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و در نهایت، مرحله‌ی آخر Final extension در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد.

دماها و غلظت‌های مختلفی از $MgCl_2$ مورد بررسی قرار گرفتند که در نهایت دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و غلظت ۲ میلی‌مول بهترین شرایط بودند و بهترین باندها برای هر دو گونه در این شرایط مشاهده شد. حجم کلی PCR، ۲۵ میکرولیتر بود که حاوی ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده بود. دو نمونه‌ی استاندارد Leishmania major (strain MRHO/IR/75/ER) و Leishmania tropica (strain MHOM/IR/01/yaza) به عنوان شاهد مثبت و آب مقطر به عنوان شاهد منفی آزمایش استفاده شدند (۲۲-۲۳).

محصولات حاصل از PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بارگذاری و سپس الکتروفورز شدند و نتایج با اشعه‌ی Ultraviolet (UV) بررسی شد. نتایج نهایی با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) مورد بررسی و تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

یافته‌ها

در این مطالعه، ۹۴ بیمار مشکوک به Leishmaniasis پوستی با انجام روش kDNA-PCR مورد بررسی قرار گرفتند. با در نظر گرفتن روش kDNA-PCR به عنوان یک روش استاندارد، ویژگی (Specificity) روش مستقیم میکروسکوپی ۱۰۰ درصد و حساسیت (Sensitivity) آن ۹۶ درصد محاسبه گردید. تکثیر الگوی انگل Leishmania با پرایمرهای F: (5'TCGCAGAACGCCCTACC3') و R: (5' AGGGGTTGGTGTA AAAATAGG 3') به صورتی است که انگل Leishmania major باندها ۶۱۵ bp و Leishmania tropica باندها ۷۴۴ bp را تشکیل می‌دهد (شکل ۱).

در مجموع، ۸۵ نفر (۹۰/۴ درصد) از بیماران، مبتلا به Leishmaniasis بودند که ۶۳ نفر (۷۴/۱ درصد) مبتلا به Leishmania major و ۲۲ نفر (۲۵/۹ درصد) مبتلا به Leishmania tropica بودند (شکل ۲).

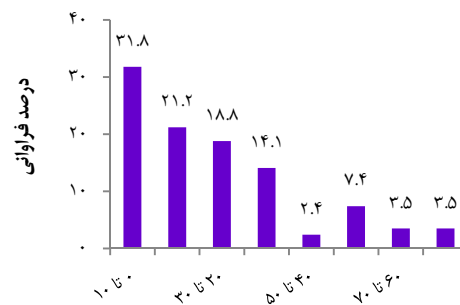
بحث

بیماری Leishmaniasis، از طرف سازمان بهداشت جهانی (WHO) یا World health organization یکی از شش بیماری عفونی مهم در دنیا معرفی شده است. این بیماری، به عنوان یک مشکل بهداشتی مهم، نه تنها در اثر عوامل خطر محیطی مانند مهاجرت‌های بی‌رویه، گسترش شهرنشینی، جنگل‌زدایی و طرح‌های آبیاری جدید ایجاد می‌شود، بلکه به عوامل خطر فردی مانند سوء تغذیه، زمینه‌ی ژنتیک، ابتلا به Human immunodeficiency virus (HIV) و غیره نیز بستگی دارد (۲۴). بررسی‌ها نشان می‌دهد که تعداد نمونه‌های Leishmaniasis در جهان به ویژه در ایران، رو به افزایش است (۸). مطالعه بر روی آلودگی به Leishmania در ایران از سال ۱۹۵۳ در شمال شرقی ایران در منطقه‌ی ترکمن صحرا (شرق استان گلستان) و لطف‌آباد (شهرستان درگز) شروع شد (۲۵).

مطابق مطالعات پیشین در خراسان، هر دو فرم خشک و مرطوب گزارش شده‌اند که فرم خشک در شهرهای سبزوار (۱۹)، مشهد (۲۰)، اطراف نیشابور (۲۱)، خواف (۲۶) و تربت حیدریه (۲۷) و فرم مرطوب در شهرهای سرخس، لطف‌آباد و اسفراین دیده شده است. مدیریت بیماری در مناطق بومی در جهت پیش‌گیری از گسترش بیماری و درمان بسیار حایز اهمیت است (۲۲). روش‌های ملکولی دارای بیشترین حساسیت در تشخیص این انگل می‌باشند. از بین این روش‌ها، حساسیت kDNA-PCR بالای ۹۰ درصد در برخی مقالات گزارش شده است (۱۹-۲۰). در این مطالعه، ویژگی روش مستقیم میکروسکوپی ۱۰۰ درصد و حساسیت آن ۹۶ درصد محاسبه گردید.

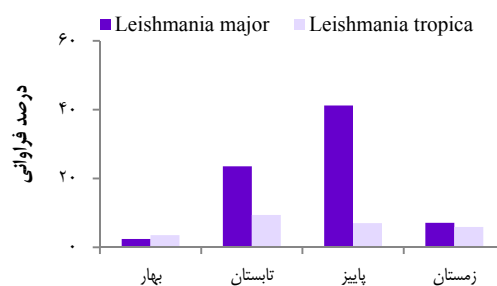
در این بررسی، تعداد مردان مبتلا به بیماری Leishmaniasis بیشتر از زنان بود، اما از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. این یافته با نتایج تحقیقات انجام شده در مطالعه‌ی خزایی و همکاران مطابقت دارد (۱۴). در مطالعات سعدآبادی و همکاران در نیشابور (۲۱)، همچنین در مطالعه‌ی ناصری و همکاران در تربت حیدریه (۲۷)، الهی و همکاران در مشهد (۲۸) و رفعتی و همکاران در دامغان (۲۹) نیز تفاوت معنی‌داری بین میزان ابتلا به Leishmaniasis در دو جنس مشاهده نشد. این امر، می‌تواند نشان دهد که در این منطقه همه‌ی افراد مواجهه‌ی یکسانی در برابر گزش پشه‌ی خاکی داشتند. در واقع، ابتلای بیشتر مردان مربوط به نوع پوشش و نوع کار در خارج از منزل و رفت و آمد به مناطق بیابانی و بیرون ماندن از منزل بعد از غروب آفتاب می‌باشد (۳۱-۳۰).

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد دامنه‌ی سنی بیماری از ۲ ماهگی تا ۸۰ سالگی متغیر است، اما در گروه سنی کمتر از ۱۰ سال ابتلا به بیماری بیشتر بوده است که به دلیل نحوه‌ی پوشش و خصوصیات رفتاری و پویایی بیشتر این سنین است؛ کودکان در این



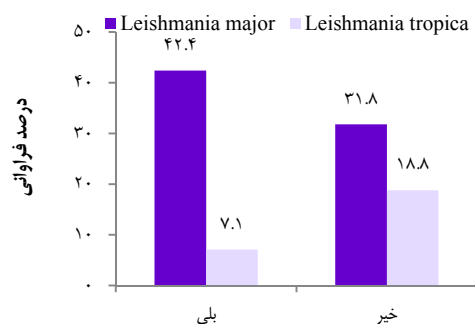
شکل ۳. فراوانی نسبی سن در مبتلایان به Leishmaniasis پوستی در شهرستان درگز طی سال‌های ۱۳۹۳-۹۴

بین محل سکونت ($P = 0/004$) و نوع ساختمان مسکونی ($P = 0/003$) با شیوع بیماری رابطه‌ی معنی‌داری وجود داشت. همچنین، مشخص گردید که موارد بیماری به طور معنی‌داری در فصل پاییز بیشتر بود ($P = 0/045$) (شکل ۴).



شکل ۴. درصد فراوانی Leishmaniasis پوستی به تفکیک فصل در شهرستان درگز طی سال‌های ۱۳۹۳-۹۴

بین ابتلا به بیماری و مواجهه با جوندگان نیز رابطه‌ی معنی‌داری وجود داشت ($P = 0/025$) (شکل ۵). بیشترین رخداد زخم‌های ناشی از Leishmania در نواحی دست و صورت بود که تفاوت معنی‌داری بین اندام مبتلا و گونه‌ی Leishmania وجود نداشت.



شکل ۵. درصد فراوانی گونه‌های Leishmania و نسبت آن در مواجهه با جوندگان در شهرستان درگز در سال‌های ۱۳۹۳-۹۴

گروه سنی، زمان بیشتری بیرون از خانه به سر می‌برند و در معرض نیش پشه‌های خاکی هستند.

به مراکز بهداشتی این شهرستان، می‌توان توصیه‌هایی مبنی بر تأکید بر پوشیدن لباس‌های بلند و آستین‌دار، عدم خوابیدن عصر در حیاط خانه یا استفاده از پشه‌بندهای مناسب، به خصوص در کودکان زیر ۱۰ سال و در فصل شیوع بیماری نمود. در مطالعه‌ی خواجه‌دلویی و همکاران (۳۰)، طالاری و همکاران (۳۲)، سرکاری و همکاران (۳۳) بیشترین موارد گزارش بیماری در گروه سنی ۱۰-۰ سال مشاهده شد. همچنین، در مطالعه‌ی صوفی‌زاده و همکاران بیشترین فراوانی در سنین ۹-۰ گزارش شده است (۳۴).

در بررسی حاضر، زخم‌های سالک در بین مبتلایان به Leishmaniasis پوستی در اندام‌های مختلف بدن مشاهده گردید و بیشترین محل ضایعه در ناحیه‌ی دست و سپس در ناحیه‌ی صورت دیده شد. در مطالعه‌ی فضایی و همکاران در میرجاوه توابع زاهدان نیز بیشتر زخم‌ها در دست بود (۳۵) و در بررسی Ullah و همکاران در پاکستان، بیشترین ضایعات در نواحی صورت و سپس، دست و پا بود (۳۶). در مطالعه‌ی شریفی و همکاران در شهرستان بم درصد بالایی از زخم‌ها روی دست بود (۳۷).

در مطالعه‌ی Kharfi و همکاران در تونس بیشترین زخم‌ها در صورت، دست و پا بودند (۳۸). یکی از عوامل مؤثر در توزیع ضایعات در بیماران مبتلا به Leishmaniasis پوستی، نوع پوشش آن‌ها می‌باشد؛ به خصوص که پشه‌های خاکی به خاطر دارا بودن ضمایم دهانی کوتاه، قادر به خون‌خواری از نواحی پوشیده‌ی بدن نیستند. در نتیجه، تعداد زخم‌ها در اندام‌هایی با پوشش کمتر؛ مانند صورت و دست و پا بیشتر دیده می‌شوند. مشاهده‌ی اغلب این زخم‌ها در اندام‌های فوقانی، به ویژه دست‌ها، یکی از ویژگی‌های Zoonotic leishmaniasis پوستی است که توسط Leishmania major ایجاد می‌شود (۳۹).

در این مطالعه، ۵۱/۸ درصد بیماران، ساکن مناطق روستایی درگز بودند که ۸۸/۶ درصد آن‌ها مبتلا به Leishmania major بودند. رابطه‌ی معنی‌داری بین محل سکونت و گونه‌ی انگل وجود داشت (P = ۰/۰۰۴). در مطالعه‌ی دهقان و همکاران در شهرستان لارستان نیز میزان ابتلا به Leishmaniasis پوستی در مناطق روستایی بالاتر از مناطق شهری بوده است. از علل این امر، می‌توان به وجود اماکن قدیمی و کاه‌گلی در مناطق روستایی، شغل افراد و عدم درمان به موقع بیماری اشاره نمود. همچنین، بافت قدیمی و مخروبه خانه‌ها، دلیلی بر افزایش ابتلا به بیماری بود و در این مطالعه، ارتباط بین ابتلا به بیماری و نوع ساختمان مسکونی ارتباط معنی‌داری وجود داشت (P = ۰/۰۰۳) (۴۰).

در این مطالعه، ۴۹/۴ درصد از بیماران با کودکان مواجهه

داشتند که بیشترین میزان مواجهه در مبتلایان به Leishmania major، ۴۲/۴ درصد و در مبتلایان به Leishmania tropica ۷/۱ درصد بود (P = ۰/۰۲۵). تعداد افراد مبتلا به Leishmania tropica که کودکان در نزدیکی محل سکونت آن‌ها نبوده‌اند، نسبت به گروه قبل بیشتر بود (شکل ۴). احتمال می‌رود نزدیکی با محل سکونت کودکان (مخزن Leishmania major) باعث تسهیل دسترسی آن‌ها توسط پشه‌های خاکی و در نتیجه، انتشار بیشتر این گونه از انگل شده است. تنوع در نحوه‌ی پراکندگی گونه‌های عامل Leishmaniasis جلدی در ایران، ارتباط مستقیمی با وجود مخازن و ناقلین بیماری در هر منطقه دارد (۴۱).

فخار و همکاران، در بررسی خود در شیراز بیان کردند موارد ابتلا به بیماری در فصل پاییز به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرده است و بیشترین موارد بروز مربوط به ماه آبان می‌باشد (۴۲). همچنین، در مطالعه‌ی حاضر، روند بیماری در فصل پاییز (۴۸/۲ درصد) نسبت به سایر فصول به طور معنی‌داری بالا بود (P = ۰/۰۴۵). بیشترین موارد ابتلای مربوط به Leishmania major (۳۵ مورد معادل ۴۱/۲ درصد) در این فصل بوده است و نیز بیشترین موارد بروز بیماری در آبان ماه (۲۰ درصد) گزارش شده است. در مطالعه‌ی مسگریان و همکاران نیز بین فصل مراجعه و موارد بیماری همین رابطه برقرار است (۴۳).

نتیجه‌گیری نهایی این که در مطالعه حاضر با انجام روش PCR-kDNA گونه‌ی Leishmania موجود در منطقه مشخص شد. 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، می‌تواند به عنوان یک ابزار، نه تنها برای دستیابی به میزان شیوع و بروز عفونت Leishmania و درمان و کنترل مفید باشد، بلکه برای شناسایی سریع گونه‌های رایج در مناطق اندمیک نیز مورد استفاده قرار گیرد (۴۴).

با توجه به مطالعات قبلی، شهرستان درگز کانون Leishmania major بوده است که با انجام این مطالعه، کانون‌هایی از Leishmania tropica نیز در این منطقه دیده می‌شود. این تغییر اپیدمیولوژی، می‌تواند ناشی از تغییرات برنامه‌های شهرداری در زمینه‌های ساخت و ساز و وجود نخاله‌های ساختمانی در برخی مناطق و همچنین، خشکسالی‌های اخیر و به دنبال آن، ورود بیشتر گوشت‌خواران برای یافتن غذا به حومه‌ی شهرها باشد. الگوی مهاجرت افراد و مسافرت به مناطق اندمیک که کانون Leishmania tropica می‌باشند نیز در ایجاد این تغییر مؤثر است. از نتایج حاصل از این مطالعه، می‌توان جهت تدوین برنامه‌ی جامع مبارزه با Anthroponotic leishmaniasis پوستی نیز در شهرستان

درگز و روستاهای تابعه‌ی آن استفاده نمود.

مشهد و مرکز بهداشت شهرستان درگز انجام شده است. بدین‌وسیله، از تمامی کمک‌های مادی و معنوی این مراکز در طول اجرای طرح قدردانی و تشکر می‌شود. همچنین، از ریاست محترم مرکز بهداشت شهرستان درگز و پرسنل زحمتکش این مرکز به دلیل مساعدت‌های اجرایی و همکاری شایسته در اجرای این طرح، صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد به شماره‌ی طرح پژوهشی ۹۳۰۷۹۰ می‌باشد. این مطالعه با حمایت معاونین محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، سازمان جهاد دانشگاهی

References

- Hassanpour K, Aghamollaei H, Golpich M, Amani J, Taheri A, Farnoosh G. Molecular epidemiological study of cutaneous leishmaniasis in the east north of Iran. *Asian Pac J Trop Dis* 2014; 4: S540-S544.
- Sacks DL, Perkins PV. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science* 1984; 223(4643): 1417-9.
- Belkaid Y, Kamhawi S, Modi G, Valenzuela J, Noben-Trauth N, Rowton E, et al. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania* major infection in the mouse ear dermis. *J Exp Med* 1998; 188(10): 1941-53.
- Saghafipour A, Rassi Y, Abai M R, Oshaghi M A, Farzinnia B, Mostafavi R, et al. Outbreak of zoonotic Cutaneous leishmaniasis: A Report. *Arch Hyg Sci* 2013; 2(2): 48-54.
- Pagheh A S, Fakhari 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): 46-52. [In Persian].
- Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet* 2007; 39(7): 839-47.
- Kammoun-Rebai W, Naouar I, Libri V, Albert M, Louzir H, Meddeb-Garnaoui A, et al. Protein biomarkers discriminate *Leishmania* major-infected and non-infected individuals in areas endemic for cutaneous leishmaniasis. *BMC Infect Dis* 2016; 16: 138.
- 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): 445-50.
- Rogers ME, Ilg T, Nikolaev AV, Ferguson MA, Bates PA. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature* 2004; 430(6998): 463-7.
- Doroodgar M, Delavari M, Doroodgar M, Abbasi A, Taherian AA, Doroodgar A. Tamoxifen induces apoptosis of *leishmania* major promastigotes in vitro. *Korean J Parasitol* 2016; 54(1): 9-14.
- Pinna RA, Silva-Dos-Santos D, Perce-da-Silva DS, Oliveira-Ferreira J, Villa-Verde DM, De Luca PM, et al. Malaria-Cutaneous Leishmaniasis co-infection: influence on disease outcomes and immune response. *Front Microbiol* 2016; 7: 982.
- Ben SA, Ben MN, Guedri E, Zaatour A, Ben AN, Bettaieb J, et al. Topical paromomycin with or without gentamicin for cutaneous leishmaniasis. *N Engl J Med* 2013; 368(6): 524-32.
- Alrajhi AA, Ibrahim EA, De Vol EB, Khairat M, Faris RM, Maguire JH. Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* major. *N Engl J Med* 2002; 346(12): 891-5.
- Khazaei S, Mohammadian Hafshejani A, Saatchi M, Salehiniya H, Nematollahi S. Epidemiological aspects of cutaneous leishmaniasis in Iran. *Arch Clin Infect Dis* 2015; 10(3): e28511.
- Kheirandish F, Chegeni SA, Kazemi B, Mohebbali M, Sarlak A, Tarahi MJ, et al. Identification of *leishmania* species using PCR assay on giemsa-stained slides prepared from cutaneous leishmaniasis patients. *Iran J Parasitol* 2013; 8(3): 382-8.
- Darvishi M, Yaghoobi-Ershadi MR, Shahbazi F, Akhavan AA, Jafari R, Soleimani H, et al. Epidemiological study on sand flies in an endemic focus of cutaneous leishmaniasis, Bushehr city, southwestern Iran. *Front Public Health* 2015; 3: 14.
- 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. *J Shahid Sadoughi Univ Med Sci* 2012; 20 (4): 464-73. [In Persian].
- Hoseini Farash BR, Mohajery M, Fata A, Shamsian SA, Rezaee A, Yazdanpanah MJ. Anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Torghabeh - Shandiz, a region with rural texture (a molecular study). *Jundishapur J Microbiol* 2013; 6(10): e8274.
- Mohajery M, Shamsian SA, Rezaee A, Hasanpoor K, Shakeri Mt, Farnoosh G, et al. Evaluation of molecular epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Sabzevar. *Med J Mashad Univ Med Sci* 2010; 53(3): 138-44.
- Mahmoodi MR, Mohajery M, Tavakkol Afshari J, Shakeri MT, Yazdan Panah MJ, Berenji F, et al. Molecular identification of *Leishmania* species causing cutaneous leishmaniasis in Mashhad, Iran. *Jundishapur J Microbiol* 2010; 3(4): 195-200.
- Saadabadi F, Mohajery M, Poostchi E, Shamsian SA. 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.
- Mohaghegh M, Fata A, Salehi G, Berenji F, Bazzaz

- MM, Rafatpanah H, et al. Molecular identification of leishmania species using samples obtained from negative stained smears. *Iran J Parasitol* 2013; 8(2): 337-41.
23. Shamsian SAA, Rezaei A, Akbarzadeh A, Farash BR. Molecular Identification of *Leishmania tropica* in an endemic border city for zoonotic cutaneous leishmaniasis (ZCL) in northeastern Iran. *J Microbiol Exp* 2015; 2(4): 00053.
 24. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004; 27(5): 305-18.
 25. Baghaei A, Parvizi P, Amirkhani A, Honarvar MR, 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 Uni Med Sci*. 2012; 14 (3): 72-81. [In Persian].
 26. Fata A, Ghodratollah 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): 50-4.
 27. 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(687): 92.
 28. Elahi R, Fata A, Berenji F. Comparing different leishmaniasis laboratory detecting methods. *Mashhad J Med Sci* 1995; 38(47): 68-72. [In Persian].
 29. Rafati N, Shaporimoghadem A, Ghorbani R. Epidemiological study of cutaneous leishmaniasis in Damghan (2000-2006). *Koomesh* 2007; 8 (4): 247-54. [In Persian].
 30. Khajedaluae M, Yazdanpanah MJ, Seyed Nozadi S, Fata A, Juya MR, Masoudi MH, et al. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in population covered by Mashhad university of medical sciences in 2011. *Med J Mashad Univ Med Sci* 2014; 57(4): 647-54.
 31. Cherabin M, Sofizadeh A, Palideh AR, Yapanggharavi AH, Yapang Gharavi M. Epidemiological characteristics of cutaneous leishmaniasis in Maraveh Tapeh district, Golestan province during 2006-2010. *J Zabol Univ Med Sci* 2012; 4(1): 19-27. [In Persian].
 32. Talari S A, Vakili Z, Moshtaghi S. Prevalence of cutaneous leishmaniasis in Kashan, 1994-2000. *Feyz* 2003; 7(2): 71-6. [In Persian].
 33. Sarkari B, Moshfe A, Pedram N, Zargar M, Yazdanpanah B, Akhondi B, et al. Serological study of visceral leishmaniasis in Boyer Ahmad township in 2005. *Armaghane-danesh* 2007; 12 (2): 69-77. [In Persian].
 34. Sofizadeh A, Faragi Far AA, Cherabi M, Badiei F, Cherabin M, Sarli J, et al. Cutaneous leishmaniasis in Gonbad Kavoods, North of Iran (2009-11): an epidemiological study. *J Gorgan Uni Med Sci* 2012; 14 (4): 100-6. [In Persian].
 35. 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.
 36. Ullah S, Jan AH, Wazir SM, Ali N. Prevalence of cutaneous leishmaniasis in Lower Dir district (N.W.F.P), Pakistan. *Journal of Pakistan Association of Dermatologists* 2009; 19: 212-21.
 37. 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): 289-93.
 38. Kharfi M, Benmously R, El Fekih N, Daoud M, Fitouri Z, Mokhtar I, et al. Childhood leishmaniasis: report of 106 cases. *Dermatol Online J* 2004; 10(2): 6.
 39. Ahmadi N, Ghafarzadeh M, Jalaligalasang A, Gholamiparizad E. An epidemiological study of cutaneous leishmaniasis with emphasis on incidence rate in Kashan, Isfahan province. *J Ilam Univ Med Sci* 2013; 21(2): 1-9. [In Persian].
 40. Dehghan A, Ghahramani F, Hashemi B. The Epidemiology of anthroponotic cutaneous leishmaniasis (ACL) in Larestan, 2006-2008. *J Jahrom Univ Med Sci* 2010; 8 (3): 7-11. [In Persian].
 41. Karimian Shirazi M, Razmi G, Naghbi A. Molecular identification of leishmania species causing cutaneous leishmaniasis in Mashhad area, Iran. *J Birjand Univ Med Sci* 2014; 21(2): 237-45. [In Persian].
 42. 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 Jahrom Univ Med Sci* 2010; 8(1): 2-6. [In Persian].
 43. Mesgarian F, Rahbarian N, Mahmoud Radi M, 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 J* 2010; 68(4): 250-6. [In Persian].
 44. Kato H, Uezato H, Katakura K, Calvopina 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.

Identification of Cutaneous Leishmaniasis Species in the Dargaz City, Iran

Abdolmajid Fata¹, Abdolrahim Rezai², Elham Moghaddas³, Faezeh Sadat Mousavi-Vafa⁴,
Seyed Aliakbar Shamsian⁵

Original Article

Abstract

Background: Cutaneous leishmaniasis is a parasitic skin disease that is endemic in many parts of the world, particularly in Iran. Although the microscopic technique is a common method of diagnosis of leishmaniasis, species of leishmania cannot be differentiated by this method. So, molecular methods have special importance.

Methods: In this study, kinetoplast-DNA polymerase chain reaction (kDNA-PCR) method was used to diagnose the leishmania species in Dargaz city, Iran. Direct slide smears were obtained from skin lesions of 94 patients suspected to the leishmaniasis referred to health centers of this city. Smears were stained using Gimsa method. PCR method was performed using specific kDNA primers. Data were analyzed using SPSS software.

Findings: Among 94 subjects with skin ulcers suspected to cutaneous leishmaniasis, 82 (87.2%) were positive by direct microscopic smear and 85 (90.4%) by PCR in which 22 patients (26%) had *Leishmania tropica* and 63 (74%) had *Leishmania major*. Sensitivity and specificity of direct microscopic examination were calculated as 96% and 100%, respectively. There were statistically significant differences between disease occurrence and seasons ($P = 0.045$), habitat ($P = 0.004$), new or old building (new or old) ($P = 0.003$), and distance to rodents' living sites ($P = 0.025$).

Conclusion: Dargaz city is a known site of zoonotic leishmaniasis in Iran; but this study shows that there are some new sites of anthroponotic leishmaniasis in this city, too. *Leishmania major* is the dominant species in Dargaz city but there is *Leishmania tropica* foci in this area, too.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis, *Leishmania. tropica*, *Leishmania. major*, Polymerase chain reaction, Iran

Citation: Fata A, Rezai A, Moghaddas E, Mousavi-Vafa FS, Shamsian SA. **Identification of Cutaneous Leishmaniasis Species in the Dargaz City, Iran.** J Isfahan Med Sch 2017; 34(413): 1582-9.

1- Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

2- Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

3- Assistant Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

4- MSc Student, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

5- Associate Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

Corresponding Author: Seyed Aliakbar Shamsian, Email: shamsiana@mums.ac.ir