مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و چهارم/شماره‌ی ۴۱۳/هفته‌ی اول اسفند ماه ۱۳۹۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۷/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۹/۲۵

شناسایی گونه‌های عامل Leishmaniasis پوستی در شهرستان درگز

عبدالمجید فتی[۱]، سید عبدالرحیم رضایی[۲]، الهام مقدس[۳]، فائزه‌سادات موسوی وفا[۴]، سید علی‌اکبر شمسیان[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 کینتوپلاست Kinetoplast-DNA (kDNA) مورد بررسی قرارگرفت. 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 کینتوپلاست 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 جوندگان ($P = ۰/۰۲۵$) 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، شمسیان 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، افریقا، 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 انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۵- دانشیار، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: سید علی‌اکبر شمسیان
Email: shamsiana@mums.ac.ir

است و هر سال، باعث مرگ میلیون‌ها نفر می‌شود. Leishmaniasis پوستی، یک مشکل بهداشتی نگران کننده برای جهان است که واکسن 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 هم اکنون 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 آلوده کننده، 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).

Zoonotic leishmaniasis پوستی، به ویژه نوع 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 این بیماری می‌شود (۱۸).

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

Kinetoplast-DNA-PCR (kDNA-PCR) روشی با حساسیت ۹۸/۷ درصد در بین روش‌های مولکولی است. جداسازی و شناسایی گونه‌های مختلف Leishmaniasis، برای درمان اختصاصی و همچنین، طراحی یک برنامه‌ی کارامد 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 Kinetoplast mini-circle DNA (kDNA) انگل Leishmania، با توالی‌های (5'TCGCAGAACGCCCCTACC3') F: و (5' AGGGGTTGGTGTAAAATAGG 3') R: توسط شرکت

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 طویل 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.

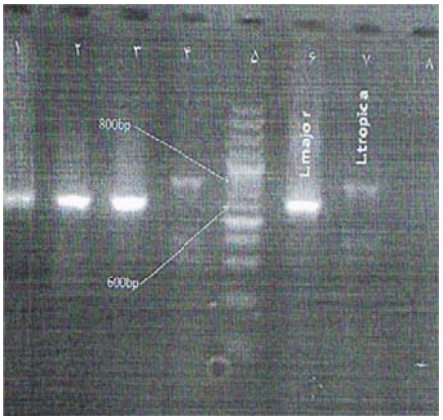
دماها و غلظت‌های مختلفی از $MgCl_2$ مورد بررسی قرار گرفتند که در نهایت دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و غلظت ۲ میلی‌مول بهترین شرایط بودند و بهترین باندها برای هر دو گونه در این شرایط مشاهده شد. حجم کلی PCR، ۲۵ میکرولیتر بود که حاوی ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده بود. دو نمونه‌ی استاندارد Leishmania major (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 (۲۳-۲۲).

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 DNA الگوی انگل Leishmania با پرایمرهای (5'TCGCAGAACGCCCCTACC3') F: و (5' AGGGGTTGGTGTAAAATAGG 3') R: به صورتی است که انگل Leishmania major باند ۶۱۵ bp و Leishmania tropica باند ۷۴۴ bp را تشکیل می‌دهد (شکل ۱).

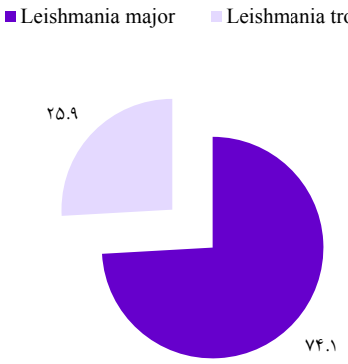
در مجموع، ۸۵ نفر (۹۰/۴ درصد) از بیماران، مبتلا به Leishmaniasis بودند که ۶۳ نفر (۷۴/۱ درصد) مبتلا به Leishmania major و ۲۲ نفر (۲۵/۹ درصد) مبتلا به Leishmania tropica بودند (شکل ۲).



شکل ۱. باندهای ایجاد شده از ۴ نمونه‌ی بیماران مبتلا به Leishmania tropica و Leishmania major

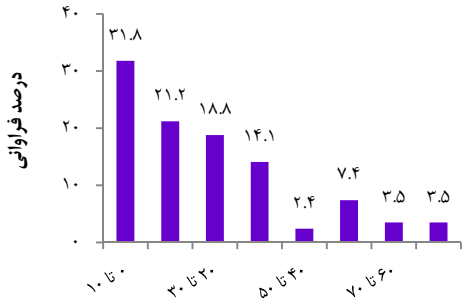
شماره‌های ۱، ۲ و ۳: Leishmania major، شماره‌ی ۴: Leishmania tropica، شماره‌ی ۵: نشانگر ۱۰۰ bp، شماره‌ی ۶: شاهد مثبت Leishmania major، شماره‌ی ۷: شاهد مثبت Leishmania tropica و شماره‌ی ۸: شاهد منفی.

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).



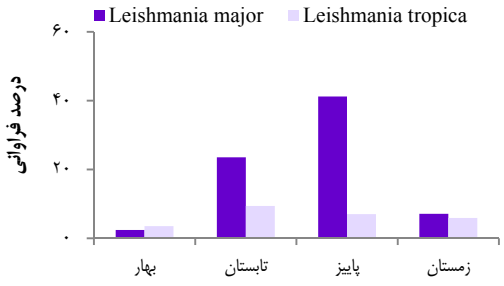
شکل ۲. میزان فراوانی گونه‌های Leishmania در شهرستان درگز در سال‌های ۹۴-۱۳۹۳

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).



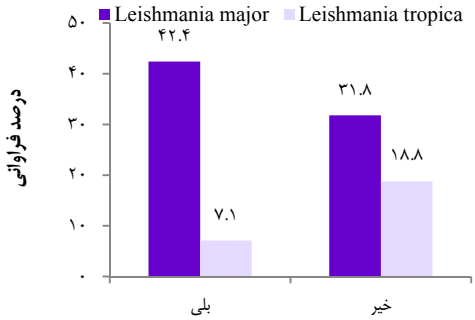
شکل ۳. فراوانی نسبی سن در مبتلایان به Leishmaniasis پوستی در شهرستان درگز طی سال‌های ۹۴-۱۳۹۳

بین محل سکونت (P = ۰/۰۰۴) و نوع ساختمان مسکونی (P = ۰/۰۰۳) با شیوع بیماری رابطه‌ی معنی‌داری وجود داشت. همچنین، مشخص گردید که موارد بیماری به طور معنی‌داری در فصل پاییز بیشتر بود (P = ۰/۰۴۵) (شکل ۴).



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

بین ابتلا به بیماری و مواجهه با جوندگان نیز رابطه‌ی معنی‌داری وجود داشت (P = ۰/۰۲۵) (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 ۹۴-۱۳۹۳

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 (۲۰-۱۹). 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

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 فضایلی 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 جوندگان 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 جوندگان در نزدیکی محل سکونت آن‌ها نبوده‌اند، نسبت به گروه قبل بیشتر بود (شکل ۴). احتمال می‌رود نزدیکی با محل سکونت جوندگان (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 kDNA- PCR 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.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد بـه شـماره‌ی طرح پژوهشی ۹۳۰۷۹۰ می‌باشـد. ایـن مطالعـه بـا حمایـت معـاونین محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، سازمان جهاد دانشگاهی مشهد و مرکز بهداشت شهرستان درگز انجام شده است. بدین‌وسـیله، از تمامی کمک های مادی و معنوی این مراکز در طول اجـرای طـرح قدردانی و تشکر می شود. همچنین، از ریاست محترم مرکز بهداشـت شهرستان درگز و پرسنل زحمتکش این مرکز به دلیل مسـاعدت‌هـای اجرایـی و همکـاری شایسـته در اجـرای ایـن طـرح، صـمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

References

1. 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.
2. Sacks DL, Perkins PV. Identification of an infective stage of Leishmania promastigotes. Science 1984; 223(4643): 1417-9.
3. 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.
4. 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.
5. Pagheh A S, 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): 46-52. [In Persian].
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Kheirandish F, Chegeni SA, Kazemi B, Mohebali 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.
16. 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.
17. 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].
18. 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.
19. Mohajery M, Shamsian SA, Rezaee A, Hasanpoor K, Shakeri Mt, Farnoosh G, et al. Evaluation of mulecular epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Sabzevar. Med J Mashad Univ Med Sci 2010; 53(3): 138-44.
20. 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.
21. 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.
22. 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. Khajedaluee 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 cautaneous 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 cutaneus 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 Kavoos, 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, Jalaligalosang 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, Naghibi 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.

Journal of Isfahan Medical School Received: 04.10.2016

Vol. 34, No. 413, 1st Week, March 2017 Accepted: 15.12.2016

Identification of Cutaneous Leishmaniasis Species in the Dargaz City, Iran

Abdolmajid Fata[1], Abdolrahim Rezai[2], Elham Moghaddas[3], Faezeh Sadat Mousavi-Vafa[4], Seyed Aliakbar Shamsian[5]

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