ORIGINAL ARTICLE

# *Epidemiological Study of Cutaneous Leishmaniasis and Identification of Etiological Species*

Abdolmajid Fata[1],
Elham Moghaddas[2],
Abdolrahim Rezee[3],
Atyeh Abdali[4],
Lida Jarahi[5],
Seyed Aliakbar Shamsian[6]

[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 anthroponootic 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

**J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 27 (158): 123 - 131 (Persian).**

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هفتم شماره ۱۵۸ اسفند سال ۱۳۹۶ (۱۳۱-۱۲۳)

# بررسی اپیدمیولوزیک 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 کانون‌های لیشمانیازیس زئونوتیک و انتروپونتیک با شیوع متفاوت گزارش شده است.. تا کنون هیچ مطالعه‌ای در شهرستان فریمان روی گونه‌های این انگل انجام نشده است، این مطالعه با هدف بررسی ژنوتایپنگ انگل در این منطقه انجام شده است.

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

**یافته‌ها:** از ۵۰ فرد مشکوک به بیماری لیشمانیوز، ۴۰ نفر(۸۰درصد) به صورت مشاهدات میکروسکوپی و ۴۲ نفر (۸۴درصد) به روش مولکولی آلوده به انگل لیشمانیا تشخیص داده شدند که ۱۳ مورد (۳۱درصد) به لیشمانیا تروپیکا و ۲۹ مورد (۶۹درصد) به لیشمانیا ماژور مبتلا بودند. دو لام منفی از نظر میکروسکوپی با روش PCR مثبت نشان داده شدند. بیش‌ترین سن افراد مبتلا بین ۱۱تا۲۰ سال با فراوانی ۲۸/۶ درصد بود و بیش‌ترین محل زخم‌های لیشمانیایی در دست (۳۸/۱درصد) 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 می‌کردند. هم‌چنین از ۲۹ بیمار مبتلا به لیشمانیا ماژور ۱۷/۲ و ۸۲/۸ درصد به ترتیب در شهر و روستا بودند (p= ۰/۰۰۴).

**استنتاج:** شهرستان فریمان به عنوان یک کانون لیشمانیازیس زئونوتیک با گونه غالب لیشمانیا ماژور می‌باشد. مطالعه بیش‌تر روی ناقلین و مخازن بیماری جهت کنترل و و یافتن راه‌هایی جهت کاهش تعداد مبتلایان ضروری به نظر می‌رسد.

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

## مقدمه

بیماری لیشمانیوز پوستی در ۹۸ کشور جهان اندمیک است. در حال حاضر ۱۲ میلیون نفر در دنیا از این بیماری رنج می‌برند. میزان بروز سالیانه بیماری در دنیا ۱ تا ۱,۵ میلیون تخمین زده می‌شود. ایران یکی از ۱۰ کشور جهان است که بیش‌ترین موارد بیماری لیشمانیوز پوستی در آن گزارش می‌گردد(۱). بیماری

**مولف مسئول: سید علی اکبر شمسیان**- مشهد- دانشکده پزشکی- گروه انگل شناسی Email: Shamsianaa@mums.ac.ir
۱. استاد، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۲. استادیار، گروه انگل شناسی و قارچ 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 قارچ 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 قارچ 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

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 فلبوتومینه منتقل می‌گردد. جوندگان 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 خون خواری 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 وعامل شهری لیشمانیا تروپیکا می‌باشد(۳). برای تشخیص بیماری، روش‌های مختلفی مورد استفاده قرارمی‌گیرد 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 ومبارزه با مخازن در مناطق مختلف ضروری است. این مطالعه با هدف بررسی اپیدمیولوژی لیشمانیوز پوستی در شهرستان فریمان انجام گرفته است.

## مواد و روش ها

این مطالعه توصیفی – مقطعی روی ۵۰ فرد مشکوک به لیشمانیوز پوستی در شهرستان فریمان طی سال‌های ۱۳۹۴تا 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. نمونه‌برداری به وسیله بیستوری و با برداشتن بافت از زیر زخم ها انجام شد به صورتی‌که تا حد امکان در نمونه‌ها خون وارد نگردد.

*روش میکروسکوپی*

لام‌ها پس از رنگ‌آمیزی به روش گیمسا مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفتند و موارد مثبت بر اساس مشاهده آماستیگوت‌های انگل در داخل یا خارج از ماکروفاژ ثبت گردید. برای استخراج DNA از لام‌های رنگ‌آمیزی 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 F: (5'TCGCAGAACGCCCCTACC3') و R: (5'AGGGGTTGGTGTAAAATAGG3')استفاده گردید که توسط شرکت طوبی نگین ساخته شدند(۵). تکثیر DNA به وسیله ترموسایکلر ASTEC-PC818, (Japan))با شرایط ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه و به دنبال آن ۳۸ چرخه شامل Denaturation در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و Annealingدر ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و Extension در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و در نهایت Final extensionدر ۷۲ درجه سانتی‌گراد 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

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

(Strain MHOM/IR/01/yaza) به عنوان شاهد مثبت وآب مقطر به عنوان شاهد منفی آزمایش استفاده شدند. محصولات به دست آمده از PCR روی ژل اگارز 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 می‌دهد.

از تعداد ۵۰ مراجعه کننده با تکنیک ملکولی ۴۲ نفر(۸۴درصد) از آن‌ها به لیشمانیا مبتلا بودند که ۱۳ مورد (۳۱درصد) به لیشمانیا تروپیکا و ۲۹ مورد (۶۹درصد) به لیشمانیا ماژور مبتلا بودند (جدول شماره ۱). دو لام منفی با تکنیک رنگ‌آمیزی 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(۱۷/۲درصد) در مناطق شهری زندگی می‌کردند. از تعداد ۱۳ فرد مبتلا به لیشمانیا تروپیکا ۱۰ نفر (۷۵ درصد) در مناطق شهری و ۳ نفر (۲۵ درصد) در مناطق روستایی زندگی می‌کردند که از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری میان افراد مبتلا به لیشمانیا ماژور در مناطق شهری و روستایی وجود دارد=p) ۰/۰۰۴ .(از کل افراد مبتلا به این بیماری ۵۴/۸ درصد را مردان و ۴۵/۲ درصد را زنان تشکیل می‌دهند. بیش‌ترین سن درگیر با بیماری درافراد 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 بیش‌تر از یک زخم بودند. بین محل سکونت=p) ۰/۴ ( و نوع ساختمان مسکونی ) =p۰/۹ (با شیوع بیماری رابطه معنی‌داری وجود نداشت. هم‌چنین مشخص شد که بیش‌ترین موارد ابتلا به بیماری در فصل تابستان با ۵۴/۸ درصد در شهریور ماه بود (جدول شماره ۱). بیش‌ترین رخداد زخم‌های ناشی از لیشمانیا در ناحیه دست بود که تفاوت معنی‌داری 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 | ۱۳(۳۱) | |
| لیشمانیا ماژور | ۲۹(۶۹) | |
| سن | | p≥0.05 |
| ۰-۱۰ | ۳(۷/۱) | |
| ۱۱-۲۰ | ۱۲(۲۸/۶) | |
| ۲۱-۳۰ | ۹(۲۱/۴) | |
| ۳۱-۴۰ | ۹(۲۱/۴) | |
| ۴۱-۵۰ | ۶(۱۴/۳) | |
| ۵۱-۶۰ | ۳(۷/۱) | |
| جنس | | p≥0.05 |
| مذکر | ۲۳(۵۴/۸) | |
| مونث | ۱۹(۴۵/۲) | |
| فصل | | p≥0.05 |
| بهار | ۷(۱۶/۷) | |
| تابستان | ۲۳(۵۴/۸) | |
| پاییز | ۱۰(۲۳/۸) | |
| زمستان | ۲(۴/۸) | |
| سابقه مسافرت | | p≤0.05 |
| دارد | ۲۵(۵۹/۵) | |
| ندارد | ۱۷(۴۰/۵) | |
| نوع ساختمان مسکونی | | p≥0.05 |
| قدیمی | ۱۹(۴۵/۲) | |
| نوساز | ۲۳(۵۴/۸) | |
| تعداد زخم | | p≤0.05 |
| یک | ۲۷(۶۴/۳) | |
| دو | ۹(۲۱/۴) | |
| بیش تر از دو | ۶(۱۴/۳) | |
| عضو درگیر | | p≥0.05 |
| دست | ۱۶(۳۸/۱) | |
| پا | ۱۲(۲۸/۶) | |
| صورت | ۱۴(۳۳/۳) | |
| شکل زخم | | p≤0.05 |
| ندول | ۱(۲/۴) | |
| پاپول | ۹(۲۱/۴) | |
| اولسر | ۲۹(۵۸) | |
| اشکال میکس | ۳(۷/۱) | |
| شغل | | p≥0.05 |
| مغازه دار | ۲(۴/۸) | |
| کشاورز | ۸(۱۹) | |
| کارگر | ۵(۱۱/۹) | |
| محصل | ۱۰(۲۳/۸) | |
| خانه دار | ۱۰(۲۳/۸) | |
| کارمند | ۳(۷/۱) | |
| راننده | ۲(۴/۸) | |
| بیکار | ۲(۴/۸) | |

بر اساس اشکال بالینی مختلف (ندول، پاپول، اولسر، اشکال میکس) بیش‌ترین نمای مشاهده شده در بیماران مبتلا با فراوانی ۵۸درصد 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 زئونتیک 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 زئونوتیک 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= ۰/۰۰۴). 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 وهمکاران 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 می باشد. 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 اندام های 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)، فضایلی و همکاران در میرجاوه(۱۹)، شریفی و همکاران در بم (۲۱) مطابقت داشت.

به طورکلی ضایعات پوستی سالک معمولاً در نقاط باز بدن و جاهایی که بیش‌تر در معرض گزش پشه خاکی است مانند صورت و دست وپا به وجود می‌آیند به خصوص که پشه‌های 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 بیش‌تر روی دست و پا ظاهر می‌شوند(۲۳، ۲۲). در این مطالعه ۶۴/۳ درصد بیماران ساکن مناطق روستایی فریمان بودند که ۸۸/۹ درصد آن‌ها مبتلا به لیشمانیا ماژور بودند. رابطه معنی‌داری بین محل سکونت و گونه انگل وجود داشت (p= ۰/۰۰۴). که با سایر مطالعات هم‌خوانی دارد. از علل این امر می‌توان به وجود اماکن قدیمی در مناطق روستایی، شغل افراد و عدم درمان به موقع بیماری اشاره نمود. هم‌چنین 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= ۰/۴). هم‌چنین روند زمانی بیماری بر اساس ماه‌های سال نشان داد که موارد بیماری در فصل تابستان افزایش داشته، بیش‌ترین موارد مربوط به شهریور ماه کم‌ترین موارد مربوط به فروردین ماه و بهمن ماه بود. در اغلب مطالعات بیش‌ترین فصل آلودگی به بیماری پاییز می‌باشد (۱۵، ۱۱) که با نتیجه حاصل از این مطالعه تفاوت دارد. شهرستان فریمان در نزدیکی مرز خراسان با افغانستان و دارای آب و هوایی گرم می‌باشد که احتمالاً فعالیت زود هنگام پشه‌ها در اواخر زمستان را باعث می‌شود و این امر بروز آن را در ماه آخر تابستان توجیه می‌کند. روش‌های متعددی در تشخیص قطعی لیشمانیازیس به کار می‌رود که روش میکروسکوپی به عنوان روش استاندارد در اغلب مطالعات و به تازگی در مطالعات جدید روش PCR معرفی شده است(۲۵، ۲۴، ۱۰). در بسیاری از مطالعاتی که روی نمونه‌های مشکوک به لیشمانیازیس جلدی صورت گرفته است روش PCR دارای حساسیت بیش‌تری از روش میکروسکوپی معرفی شده است که این امرمی‌تواند 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 نمونه‌هایی که با اسمیر مستقیم منفی شده‌اند در PCR مثبت نشان داده شدند(۲۸، ۲۶). به عنوان نتیجه‌گیری نهایی می‌توان گفت که استفاده از روش PCR در تعیین گونه‌های انگل‌های 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، می‌تواند 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 گونه‌های رایج در مناطق اندمیک نیز مورد استفاده قرار گیرد(۲۱). جنس‌های مختلف لیشمانیا جزء خانواده تریپانوزوماتیده و رده کینتوپلاستیده است. KDNA-PCR روشی ملکولی با پرایمرهای اختصاصی طراحی شده روی DNA قسمت کینتو پلاست است که بسیار اختصاصی عمل می‌کند (۱۰).

نتیجه مطالعه، حاکی از موجود بودن هر دو فرم لیشمانیوز پوستی آنتروپونوتیک و زئونوتیک(شکل غالب) در شهرستان فریمان می‌باشد. این نقشه اپیدمیولوژی می‌تواند ناشی از ساخت و سازهای بی‌رویه در شهرها و روستاها، انباشته شدن نخاله‌های ساختمانی و زباله‌ها در نزدیکی مساکن 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 می‌کند، شیوه زندگی افراد و تغییرات اکولوژیکی باشد. از نتایج به دست آمده از این مطالعه می‌توان جهت

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

## سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد به شماره طرح پژوهشی ۹۳۰۷۷۹ می‌باشد. 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.

## References

1. 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.
2. Yaghoobi-Ershadi MR, Hanafi-Bojd AA, Javadian E, Jafari R, Zahraei-Ramazani AR, Mohebali M. A new focus of cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania tropica. Saudi Med J. 2002; 23(3): 291-294.
3. Molyneux DH, Ashford RW. The biology of Trypanosoma and Leishmania, parasites of man and domestic animals. UK: London ; Taylor & Francis Ltd.1983.
4. 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)
5. 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.
6. Oshaghi MA, Rasolian M, Shirzadi MR, Mohtarami F, Doosti S. First report on isolationof Leishmania tropica from sandflies of a classical urban Cutaneous leishmaniasis focus in southern Iran. Exp Parasitol. 2010; 126(4): 445-450.
7. 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)
8. 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)
9. 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.
10. Abdolmajid F, 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): 50-54.

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 Aghaee 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, Badiee 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, Mohebali 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)