ORIGINAL ARTICLE

Comparative Evaluation of Microscopic and Molecular Methods for the Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis in Two Endemic Foci in Northern and Central Iran, 2024-2026

Hajar Ziaei Hezarjaribi[1]
Amirmohammad Fallahi Lima[2,3]
Shakiba Afsharzadeh[4]
Hedieh Hatamipour[3]

[1] Professor, Department of Medical Parasitology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] MSc in Medical Parasitology,Toxoplasmosis Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] MSc, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] PharmD Student, Student Research Committee, School of Pharmacy, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

(ReceivedAugust 23, 2026; Accepted October 18, 2026)

Abstract

Background and purpose: Cutaneous leishmaniasis (CL) is an important endemic parasitic disease in several regions of Iran. Although direct microscopy is widely used for diagnosis, its sensitivity may be limited, particularly in specimens with low parasite loads. This study aimed to compare the detection of Leishmania infection by direct microscopic examination and conventional polymerase chain reaction (PCR) in patients with suspected CL from two endemic foci in northern and central Iran.

Materials and methods: This comparative cross-sectional study was conducted between October 2024 and January 2026 and included 110 individuals with suspected cutaneous leishmaniasis attending healthcare centers in Golestan and Semnan Provinces. Demographic and clinical data were collected using a questionnaire, and samples were obtained from skin lesions. Microscopic examination was performed using Giemsa staining, and parasite load was graded according to the World Health Organization protocol. DNA was extracted using the phenol-chloroform-isoamyl alcohol method, and Leishmania DNA was detected by conventional PCR using the LITSR/L5.8S primer pair. Statistical analyses were performed using SPSS version 20.

Results: Of the 110 samples, 97 (88.2%) were PCR-positive, compared with 83 (75.5%) that were positive by direct microscopic examination. The overall agreement between the two methods was 87.3%, with a Cohen's kappa coefficient of 0.58, indicating moderate agreement. A significant association was found between a history of previous treatment with Glucantime and the results of both diagnostic methods ($P < 0.001$). In contrast, age, sex, place of residence and lesion site were not significantly associated with the diagnostic results. The hands were the most frequently affected site, accounting for 49.1% of lesions.

Conclusion: Conventional PCR detected a higher proportion of positive cases than direct microscopy among patients with suspected cutaneous leishmaniasis. Using molecular and microscopic methods in combination may improve the laboratory detection of CL, particularly in endemic regions of Iran.

Keywords: cutaneous leishmaniasis, polymerase chain reaction, microscopic examination, ITS1

J Mazandaran Univ Med Sci 2026; 36 (263): 112-123 (Persian).

Corresponding Author: Amirmohammad Fallahi Lima - Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: amirlimaaa9@gmail.com)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-15]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و ششم شماره ۲۶۳ آبان سال ۱۴۰۵ (۱۲۳-۱۱۲)

ارزیابی مقایسه‌ای روش‌های میکروسکوپی و مولکولی برای تشخیص لیشمانیوز پوستی در دو کانون اندمیک در شمال و مرکز ایران، طی سال‌های ۱۴۰۴ -۱۴۰۳

هاجر ضیایی هزارجریبی[۱]
امیرمحمد فلاحی لیما[۲و۳]
شکیبا افشارزاده[۴]
هدیه حاتمی پور[۳]

چکیده

سابقه و هدف: بیماری لیشمانیوز پوستی یک بیماری انگلی مهم و اندمیک در بسیاری از مناطق ایران است. اگر چه بررسی مستقیم میکروسکوپی به‌طور گسترده برای تشخیص این بیماری مورد استفاده قرار می‌گیرد، اما حساسیت آن ممکن است در نمونه‌هایی با بار انگلی پایین محدود باشد. این مطالعه با هدف شناسایی عفونت *Leishmania* با استفاده از بررسی مستقیم میکروسکوپی و Conventional PCR در بیماران مشکوک به لیشمانیوز پوستی در دو کانون اندمیک در شمال و مرکز ایران، انجام پذیرفت.

مواد و روش ها: این مطالعه مقایسه‌ای-مقطعی، از مهر ماه ۱۴۰۳ تا پایان دی ماه ۱۴۰۴ بر روی ۱۱۰ فرد مشکوک به لیشمانیوز پوستی مراجعه کننده به مراکز درمانی استان‌های گلستان و سمنان انجام شد. اطلاعات دموگرافیک و بالینی از طریق پرسشنامه ثبت و از ضایعات پوستی نمونه‌برداری شد. بررسی میکروسکوپی با رنگ‌آمیزی گیمسا و درجه‌بندی بار انگلی مطابق پروتکل سازمان بهداشت جهانی انجام شد. استخراج DNA به روش فنل-کلروفرم-ایزوآمیل الکل و شناسایی مولکولی با استفاده از (Conventional Polymerase Chain Reaction) Conventional PCR و پرایمرهای LITSR/L5.8S صورت گرفت. تحلیل آماری با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام شد.

یافته‌ها: از مجموع ۱۱۰ نمونه، ۹۷ مورد (۸۸/۲ درصد) با PCR و ۸۳ مورد (۷۵/۵ درصد) با بررسی میکروسکوپی مستقیم مثبت شدند. میزان توافق بین دو روش ۸۷/۳ درصد و ضریب کاپای کوهن ۰/۵۸ (توافق متوسط) بود. سابقه درمان با گلوکانتیم با نتیجه هر دو روش تشخیصی ارتباط آماری معنی‌داری داشت($P< ۰/۰۰۱$). سن، جنسیت، محل سکونت و محل ضایعه با نتایج هیچ کدام از دو روش تشخیصی ارتباط آماری معنی‌داری نداشتند. بیش‌ترین فراوانی ضایعات مربوط به دست‌ها (۴۹/۱ درصد) بود.

استنتاج: Conventional PCR در مقایسه با میکروسکوپی، موارد بیش‌تری از عفونت مشکوک به لیشمانیوز پوستی را شناسایی کرد. استفاده همزمان از روش‌های مولکولی و میکروسکوپی می‌تواند به بهبود شناسایی عفونت لیشمانیا در مناطق اندمیک ایران کمک کند.

واژه های کلیدی: لیشمانیوز پوستی، واکنش زنجیره ای پلیمر، روش میکروسکوپی، ITS1

مولف مسئول: امیر محمد فلاحی ساری، مجتمع پیامبر اعظم(ص)، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران **Email:** amirlimaaa9@gmail.com
۱. استاد، گروه انگل شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. کارشناسی ارشد انگل شناسی پزشکی، مرکز تحقیقاتی توکسوپلاسموز، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. کارشناسی ارشد ،کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴.دانشجوی داروسازی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران
تاریخ دریافت : ۱۴۰۵/۶/۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۴۰۵/۶/۶ تاریخ تصویب : ۱۴۰۵/۷/۲۶

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-15]

مقدمه

لیشمانیوز یکی از بیماری‌های بومی (اندمیک) در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری جهان محسوب می‌شود. این بیماری به دلیل گستردگی جغرافیایی، تنوع بالینی و پیامدهای بهداشتی و اجتماعی، مورد توجه ویژه سازمان جهانی بهداشت قرار گرفته و در زمره ۱۰ بیماری مهم نواحی گرمسیری و نیمه‌گرمسیری طبقه‌بندی شده است(۱). عامل ایجاد کننده این بیماری، انگل تک‌یاخته‌ای از راسته کینتوپلاستیدا و خانواده تریپانوزوماتیده است که بسته به مرحله زیستی خود، در یکی از دو فرم آماستیگوت یا پروماستیگوت در میزبانان مشاهده می‌شود. فرم آماستیگوت داخل سلول‌های ماکروفاژ میزبانان مهره‌دار یافت می‌شود، در حالی که فرم پروماستیگوت در دستگاه گوارش پشه‌های خاکی ناقل رشد و تکثیر می‌یابد(۲).

اشکال بالینی بیماری لیشمانیوز بسته به عواملی نظیر گونه و جنس انگل، و هم‌چنین وضعیت ایمنی میزبان، متغیر است. به‌عنوان مثال، برخی گونه‌های عامل لیشمانیوز پوستی ممکن است در شرایط خاص منجر به بروز فرم احشایی بیماری شوند. همچنین، گونه‌هایی که به‌طور معمول عامل لیشمانیوز احشایی هستند، می‌توانند در برخی موارد آسیب‌های پوستی ایجاد کنند(۳).

شایع‌ترین شکل بیماری، لیشمانیوز پوستی است که خود به دو فرم خشک (شهری) و مرطوب (روستایی) تقسیم می‌شود. این دو فرم از نظر اپیدمیولوژی، ویژگی های بالینی بیماری، مدت زمان بیماری، ناقلین و مخازن دارای تفاوت های اساسی می باشند(۴).

لیشمانیوز جلدی به دلیل شیوع در مناطق مختلف کشور، دشواری و طولانی بودن درمان آن و مقاومت گزارش شده در برابر مگلومین آنتی‌مونات (گلوکانتیم) به عنوان داروی انتخابی اول برای درمان، احتمال عفونت ثانویه و تحمیل بار اقتصادی بر سیستم بهداشتی کشور، یک بیماری مهم در ایران محسوب می‌شود(۵، ۶).

به طور معمول تشخیص لیشمانیوز پوستی بر اساس علایم کلینیکی یافت شده در بیماران و تأیید آن از طریق روش‌های پارازیتولوژی از جمله آزمایش مستقیم و یا کشت می‌باشد. اگر چه روش مشاهده مستقیم با میکروسکوپ ساده و کاربردی ترین روش در شناسایی انگل *لیشمانیا* می‌باشد اما حساسیت پایین آن در تشخیص موارد دارای تعداد کم انگل نشان دهنده ضعف این روش می‌باشد(۷).

امروزه جهت شناسایی گونه های انگل *لیشمانیا* از انواع روش های مولکولی مانند انواع PCR استفاده می‌شود. از جمله مزایای روش مولکولی می توان به مواردی مانند نیاز کم به DNA عدم تأثیر شرایط مخدوش کننده محیط و میزبان و قابلیت بررسی تعداد زیادی نمونه در یک زمان کوتاه و حساسیت بالای تست اشاره نمود. همچنین تکنیک‌های مختلف PCR روی توالی‌های هدف مختلف *لیشمانیا* استفاده می‌شود(۸، ۹).

تشخیص زودهنگام، درمان موفقیت‌آمیز و افتراق لیشمانیوز پوستی از سایر بیماری‌های پوستی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است(۱۰). با توجه به این که حدود ۹۰ درصد موارد لیشمانیوز جلدی از ۸ کشور جهان شامل افغانستان، برزیل، ایران، پرو، عربستان سعودی، سوریه، الجزایر و سودان است و همچنین سالک در برخی از استان های ایران از جمله اصفهان، خوزستان، گلستان، بوشهر و کرمان با درجات متفاوتی از شیوع و در بیش‌تر استان های کشور نیز به صورت پراکنده دیده می شود(۱۱، ۱۲). با توجه به شیوع بالای این بیماری در استان‌های گلستان و سمنان و همچنین تنوع و غیرمعمول بودن تظاهرات بالینی لیشمانیوز پوستی در برخی موارد، تشخیص صحیح بیماری می‌تواند با چالش‌هایی همراه باشد. از این رو، استفاده از روش‌های تشخیصی مناسب و متناسب با شرایط بالینی و آزمایشگاهی ضروری است. روش میکروسکوپی به دلیل ویژگی بالا و روش‌های مولکولی به دلیل حساسیت قابل توجه، می‌توانند نقش مهمی در شناسایی عفونت لیشمانیا در نمونه‌های بالینی داشته باشند(۱۳). با این حال انتخاب هر یک از روش های ذکر شده به عنوان استاندارد مرجع برای مطالعات تشخیصی

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-15]

لیشمانیوز پوستی، همچنان یک چالش شناخته شده است(۱۴). با توجه به شیوع بالای لیشمانیوز پوستی در استان‌های گلستان و سمنان و تنوع و غیرمعمول بودن تظاهرات بالینی بیماری در برخی موارد، تشخیص صحیح آن می‌تواند با چالش‌هایی همراه باشد. با این وجود، مطالعات محدودی مخصوصا در سال های اخیر، به مقایسه هم‌زمان عملکرد روش میکروسکوپی و روش مولکولی PCR در جمعیت بیماران مشکوک به لیشمانیوز پوستی در این دو کانون اندمیک پرداخته‌اند و داده‌های مقایسه‌ای موجود درباره میزان توافق این دو روش تشخیصی در این مناطق همچنان محدود است. از این رو، استفاده از روش‌های تشخیصی مناسب با شرایط بالینی و آزمایشگاهی این مناطق ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین، مطالعه حاضر با هدف مقایسه شناسایی میکروسکوپی و مولکولی *لیشمانیا* در نمونه‌های بالینی بیماران مشکوک به لیشمانیوز پوستی در استان‌های گلستان و سمنان طراحی و اجرا گردید تا داده‌های تشخیصی تکمیلی برای این دو کانون اندمیک فراهم آورد.

مواد و روش ها

این مطالعه مقایسه‌ای-مقطعی، تصویب شده در کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی مازندران به کد اخلاق IR.MAZUMS.REC.1404.110، از ابتدای مهر ماه ۱۴۰۳ تا پایان دی ماه ۱۴۰۴، بر روی افراد مشکوک به لیشمانیوز پوستی مراجعه کننده به دو مرکز درمانی مورد مطالعه در استان‌های گلستان و سمنان، انجام شد. افراد دارای ضایعات پوستی مشکوک به لیشمانیوز، از جمله پاپول، ندول یا زخم پوستی با روند پیشرونده، حاشیه برجسته و مشخص و گاهی همراه با ترشح یا دلمه وارد مطالعه شدند. به‌منظور جمع‌آوری و ثبت اطلاعات، پرسشنامه‌ای مرتبط با اهداف مطالعه طراحی و استفاده شد که اطلاعات دموگرافیک و بالینی افراد مورد مطالعه، از جمله سن، جنسیت، مشخصات ضایعه پوستی و سایر یافته‌های بالینی مرتبط در آن ثبت گردید. سپس از افراد واجد معیارهای ورود شامل وجود ضایعه پوستی مشکوک به لیشمانیوز پوستی با ویژگی‌های بالینی مربوطه (پاپول، ندول یا زخم با روند پیشرونده و حاشیه برجسته، همراه یا بدون ترشح یا دلمه) و ارائه رضایت آگاهانه، معیارهای خروج نیز شامل عدم امکان اخذ رضایت آگاهانه جهت شرکت در مطالعه و قابل ارزیابی نبودن نمونه برای انجام تست های مربوطه در نظر گرفته شد بود نمونه‌گیری به روش در دسترس (convenience sampling) از ضایعات پوستی انجام شد و نمونه‌ها پس از ثبت اطلاعات مربوطه در پرسشنامه، تحت بررسی میکروسکوپی و مولکولی به‌منظور شناسایی عفونت *لیشمانیا* قرار گرفتند.

پس از پاک‌سازی ضایعه و برداشتن دلمه و ترشحات، حاشیه ضایعه با اسکالپل استریل خراش داده شد و سروزیته حاصل روی لام منتقل گردید و از ورود خون به نمونه تا حد امکان جلوگیری شد و پس از خشک شدن کامل اسمیرها، رنگ‌آمیزی با رنگ گیمسا انجام شد. لام های رنگ‌آمیزی شده پس از آماده‌سازی، به وسیله میکروسکوپ نوری با عدسی شیئی با بزرگنمایی ۱۰۰ و با هدف شناسایی اشکال آماستیگوت انگل *لیشمانیا* در داخل ماکروفاژ های موجود در نمونه مورد بررسی قرار گرفت (تصویرشماره ۱). در موارد مثبت، وجود ساختارهای مورفولوژیک مشابه با آماستیگوت‌های *لیشمانیا*، از جمله اجسام گرد یا بیضوی کوچک و کینتوپلاست، مورد توجه قرار گرفت و نمونه های مثبت بر اساس میزان بار انگلی، مطابق با پروتکل سازمان جهانی بهداشت (WHO) از یکدیگر تفکیک و درجه‌بندی شدند. به‌طوری‌که ۶+ نشان دهنده وجود ۱۰۰ انگل یا بیش‌تر در هر میدان میکروسکوپی، ۵+ نشان دهنده وجود ۱۰ تا ۱۰۰ انگل در هر میدان میکروسکوپی، ۴+ نشان دهنده وجود ۱ تا ۱۰ انگل در هر میدان میکروسکوپی، ۳+ نشان دهنده وجود ۱ تا ۱۰ انگل در هر ۱۰ میدان

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-15]

میکروسکوپی، ۲+ نشان دهنده وجود ۱ تا ۱۰ انگل در هر ۱۰۰ میدان میکروسکوپی و ۱+ نشان دهنده وجود ۱ تا ۱۰ انگل در هر ۱۰۰۰ میدان میکروسکوپی می باشد(۱۵).

پس از طی کردن مراحل فوق، اسمیر های تهیه شده جهت بررسی روش مولکولی مورد استفاده قرار گرفتند. استخراج DNA به روش دستی فنل–کلروفرم–ایزوآمیل الکل از اسمیر های میکروسکوپی انجام شد. در مرحله نخست، سطح لام ها با ۵۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده پوشانده شد، سپس سطح لام‌ها با استفاده از ابزار مناسب خراشیده شد و محتویات حاصل به میکروتیوب‌های ۱/۵ منتقل گردید. میکروتیوب‌ها به‌خوبی ورتکس شدند و به مدت حدود ۳۰ دقیقه در دمای محیط قرار گرفتند. پس از آن، ۱۰ – ۵ میکرولیتر پروتئیناز K (شرکت یکتا تجهیز) با غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به نمونه‌ها اضافه شد. به‌منظور هضم پروتئین‌های موجود در نمونه توسط پروتئیناز K، میکروتیوب‌ها به مدت ۲–۳ ساعت در بن‌ماری با دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از این مرحله، به‌منظور غیر فعال‌سازی پروتئیناز K، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در مرحله بعد، نمونه‌ها از بن‌ماری خارج شدند و پس از اندکی سرد شدن، ۵۰۰ میکرولیتر از محلول فنل به هر نمونه اضافه شد و محتویات میکروتیوب‌ها به‌خوبی مخلوط شدند. مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، فاز شفاف رویی که حاوی DNA بود، با دقت به یک میکروتیوب استریل جدید منتقل شد. به‌منظور حذف و شست‌وشوی باقی مانده فنل، حجمی معادل حجم فاز شفاف حاصل، کلروفرم به نمونه اضافه شد و محتویات میکروتیوب به‌خوبی مخلوط شدند تا مخلوطی با ظاهر شیری رنگ ایجاد شود. سپس نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و فاز شفاف رویی به میکروتیوب استریل دیگری منتقل گردید. در ادامه، به‌منظور تغلیظ و رسوب‌دهی DNA، معادل ۰/۱ حجم فاز شفاف حاصل، استات سدیم ۳ مولار و دو برابر حجم کل نمونه، اتانول مطلق سرد به آن اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد در فریزر قرار گرفتند. پس از آن، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و مایع رویی به‌آرامی خارج شد. به‌منظور شست‌وشوی نمک‌های موجود در رسوب DNA، حدود ۱۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد به رسوب اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. این مرحله دو بار تکرار شد(۱۶).

در مرحله نهایی، با توجه به اثر مهاری اتانول بر واکنش PCR، پس از خارج کردن کامل اتانول از میکروتیوب، میکروتیوب‌ها به‌صورت وارونه روی گاز استریل قرار داده شدند تا اتانول باقی مانده به‌طور کامل تبخیر شود. سپس ۵۰ – ۳۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به رسوب DNA اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا DNA به‌طور کامل در آب حل شود. همچنین غلظت و خلوص DNA استخراج شده از تمامی نمونه‌ها با استفاده از دستگاه Nano Drop پیش از انجام PCR ارزیابی و تأیید شد. در انتها، DNA استخراج شده برای انجام تست Conventional PCR مورد استفاده قرارگرفت.

به‌منظور انجام Conventional PCR، ابتدا پرایمرهای تهیه شده (شرکت سینا کلون)، مطابق دستورالعمل شرکت سازنده رقیق شدند. از یک جفت پرایمر شامل پرایمر Forward با نام LITSR و پرایمر Reverse با نام L5.8S جهت شناسایی طول ۳۵۰- ۳۰۰ bp از DNA انگل *لیشمانیا* استفاده گردید (جدول شماره ۱) (۱۷). همچنین برای کنترل مثبت از سویه استاندارد *لیشمانیا ماژور* (MRHO/IR/75/ER) استفاده شد و در نهایت مطابق جدول شماره ۲، مقادیر مربوطه اضافه گردید. سپس میکروتیوب‌ها در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شدند و در

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-15]

نهایت محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد تفکیک گردید. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ تحلیل شدند. برای بررسی ارتباط نتایج بین متغیرهای دموگرافیک و بالینی با نتایج هر یک از دو روش تشخیصی PCRو میکروسکوپی، از آزمون کای‌اسکوئر و آزمون دقیق فیشر استفاده شد. میزان توافق بین نتایج دو روش تشخیصی با استفاده از ضریب کاپای کوهن (Cohen's kappa) ارزیابی شد، از آزمون مک‌نمار جهت مقایسه نرخ مثبت شدن دو روش نیز استفاده گردید. در تمامی آزمون‌های آماری، مقدار P کم‌تر از ۰/۰۵ به‌عنوان سطح معنی‌داری آماری در نظر گرفته شد.

جدول شماره ۱: توالی پرایمر های Forward و Reverse استفاده شده در تست Conventional PCR

LITSR (Forward)	5′-CTGGATCATTTTCCGATG-3′
L5.8S (Reverse)	5′-TGATACCACTTATCGCACTT-3′

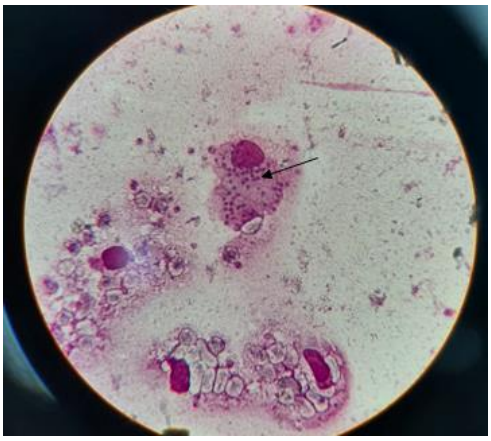
جدول شماره ۲: مواد و مقادیر مورد استفاده شده در تست Conventional PCR

مواد لازم	مقدار برای یک میکروتیوب
Master Mix 2X	12.5 µl
Primers F + R (10pmol)	2 µl
DNA Template	5 µl
D.W	5.5µl
Total volume	25 µl

یافته ها

در این مطالعه، در مجموع ۱۱۰ نمونه از افراد مشکوک به لیشمانیوز پوستی به تفکیک ۴۹ مورد از استان گلستان و ۶۱ مورد سمنان، با علائم مرتبط مورد بررسی قرار گرفتند.که از نظر جنسیت، ۷۲ نفر (۶۵/۵ درصد) مرد و ۳۸ نفر (۳۴/۵ درصد) زن بودند. از نظر سنی، ۹ نفر (۸/۲ درصد) کم‌تر از ۲۰ سال، ۶۴ نفر (۵۸/۲ درصد) در محدوده سنی ۲۱ تا ۴۰ سال و ۳۷ نفر (۳۳/۶ درصد) بیش از ۴۰ سال سن داشتند. از نظر محل سکونت، ۶۸ نفر (۶۱/۸ درصد) ساکن مناطق روستایی و ۴۲ نفر (۳۸/۲ درصد) ساکن مناطق شهری بودند. همچنین، ۲۲ نفر (۲۰ درصد) سابقه درمان مرتبط با بیماری داشتند، در حالی که ۸۸ نفر (۸۰ درصد) فاقد سابقه درمان مرتبط بودند.

از مجموع ۱۱۰ نمونه، ۹۷ مورد (۸۸/۲ درصد) با روشPCR و ۸۳ مورد (۷۵/۵ درصد) با بررسی مستقیم میکروسکوپی مثبت گزارش شدند که از موارد مثبت به روش میکروسکوپی ۴۱ نمونه دارای بار ۴+، ۱۵ نمونه بار ۳+، ۱۳ نمونه ۲+ و ۱۴ نمونه ۱+ بودند. بررسی ارتباط جنسیت با نتایج روش‌های تشخیصی نشان داد که بین جنسیت و نتیجه PCR ارتباط آماری معنی‌داری وجود نداشت. همچنین، ارتباط جنسیت با نتیجه بررسی میکروسکوپی نیز از نظر آماری معنی‌دار نبود.



تصویر شماره ۱: شناسایی آماستیگوت های لیشمانیا در بیماران مشکوک به لیشمانیوز پوستی

در بررسی محل سکونت نیز، میزان مثبت بودن PCRدر افراد ساکن مناطق روستایی ۵۷ مورد از ۶۸ نفر و در افراد ساکن مناطق شهری ۴۰ مورد از ۴۲ نفر بود. با وجود تفاوت مشاهده شده، ارتباط محل سکونت با نتیجه PCR از نظر آماری معنی‌داری نبود. همچنین بین محل سکونت و نتیجه بررسی میکروسکوپی نیز ارتباط معناداری مشاهده نشد.

در ارتباط با سابقه درمان با گلوکانتیم، از ۲۲ فرد دارای سابقه درمان، ۱۰ نفر در PCR و ۷ نفر در بررسی میکروسکوپی مثبت بودند، در حالی که در افراد فاقد سابقه درمان، به‌ترتیب ۸۷ و ۷۶ مورد مثبت مشاهده شد. تحلیل آماری نشان داد که سابقه درمان با نتیجه هر دو روش تشخیصی ارتباط آماری معنی‌داری داشت.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-15]

از نظر مدت زمان وجود زخم، در گروه دارای زخم کم‌تر از یک هفته، از ۵۸ مورد، ۵۰ مورد PCR و ۴۶ مورد میکروسکوپی مثبت بود. در گروه با مدت زخم یک تا دو هفته، به‌ترتیب ۲۸ و ۲۵ مورد مثبت و در گروه دارای زخم بیش از دو هفته، ۱۹ و ۱۲ مورد مثبت گزارش شد. نتایج تحلیل آماری نشان داد که ارتباط مدت زمان وجود زخم با نتیجه PCR معنادار نبود. در حالی که بین مدت زمان وجود زخم و نتیجه بررسی میکروسکوپی ارتباط آماری معنی‌داری مشاهده شد.

همچنین، از نظر محل ضایعه، بیش‌ترین فراوانی ضایعات مربوط به دست با ۵۴ مورد (۴۹/۱ درصد) بود و پس از آن صورت با ۳۲ مورد (۲۹/۱ درصد)، پا با ۱۵ مورد (۱۳/۶ درصد) و سایر نواحی تنه با ۹ مورد (۸/۲ درصد) قرار داشتند. با این حال، ارتباط محل ضایعه با نتیجهPCR و همچنین با نتیجه بررسی میکروسکوپی نیز از نظر آماری معنی‌دار نبود.

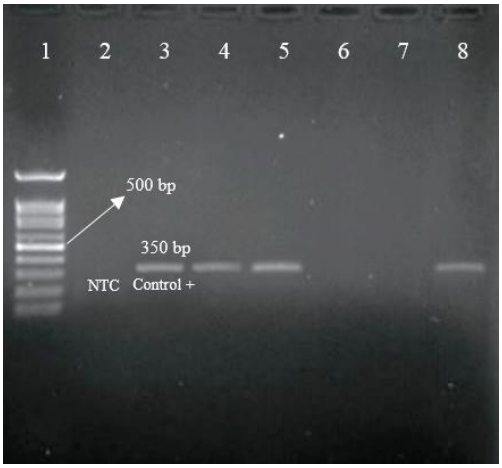
در مجموع، نتایج نشان داد که سابقه درمان مرتبط با بیماری با هر دو روش تشخیصی PCR و میکروسکوپی ارتباط معنی‌دار داشت. همچنین، مدت زمان وجود زخم با نتیجه بررسی میکروسکوپی ارتباط معناداری نشان داد، اما با نتیجه PCR ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد. سایر متغیرهای بررسی شده شامل سن، جنسیت، محل سکونت و محل ضایعه ارتباط آماری معنی‌داری با نتایج هیچ یک از دو روش تشخیصی نشان ندادند (جدول شماره ۳).

پس از انجام تست PCR و بر اساس مقایسه باندهای مشاهده شده با باندهای لدر، اندازه قطعات تکثیر یافته در نمونه‌های مثبت در محدوده ۳۵۰ جفت باز، که مطابق با طول استاندارد ناحیه ITS1 ژنومی *لیشمانیا* می‌باشد، مشاهده گردید. این نتایج با اندازه مورد انتظار قطعات ITS1 در گونه‌های مختلف *لیشمانیا* مطابقت داشته و نشان دهنده عملکرد صحیح روش PCR بوده است. همچنین حضور باند در کنترل مثبت و مطابق با اندازه مورد انتظار و عدم وجود باند در کنترل منفی، تأییدی بر صحت واکنش می باشد (تصویر شماره ۲). میزان توافق بین نتایج PCR و بررسی مستقیم میکروسکوپی ۸۷/۳ درصد بود. ضریب توافق کاپای کوهن برابر با ۰/۵۸ به دست آمد که نشان دهنده توافق متوسط بین دو روش تشخیصی است. در مقایسه زوجی نتایج PCR و بررسی میکروسکوپی، هر ۸۳ مورد مثبت در بررسی میکروسکوپی با PCR نیز مثبت بودند، در حالی که ۱۴ مورد PCR مثبت و میکروسکوپی منفی مشاهده شد و هیچ موردی از PCR منفی و میکروسکوپی مثبت مشاهده نشد. آزمون دقیق مک نمار نشان داد که توزیع نتایج دو روش تفاوت معنا داری دارد(P <۰/۰۰۱).

جدول شماره ۳: توزیع فراوانی ویژگی‌های دموگرافیک افراد مورد مطالعه و بررسی ارتباط آن‌ها با نتایج روش‌های تشخیصی PCR و میکروسکوپی

متغیر	طبقه‌بندی	تعداد کل (درصد)	PCR مثبت (درصد)	OR (95CIدرصد)	P-value PCR	میکروسکوپی مثبت (درصد)	OR (95CIدرصد)	سطح معنی داری میکروسکوپی
جنسیت	مرد	۷۲ (۶۵/۵)	۶۴ (۸۸/۹)	مرجع	۰/۷۶۳	۵۵ (۷۶/۴)	مرجع	۰/۸۱۷
	زن	۳۸ (۳۴/۵)	۳۳ (۶۸/۸)	۰/۸۳(۰/۲۵–۲/۷۲)		۲۸ (۷۳/۷)	۰/۸۷(۰/۳۵–۲/۱۴)	
سن	۲۰≥	۹ (۸/۲)	۷ (۷۷/۸)	مرجع	۰/۲۷۲	۵ (۵۵/۶)	مرجع	۰/۲۶۴
برحسب سال	۲۱ – ۴۰	۶۴ (۵۸/۲)	۵۹ (۹۲/۲)	۳/۳۷(۰/۵۵–۲۰/۷۵)		۵۱ (۷۹/۷)	۳/۱۴(۰/۷۴–۱۳/۳۷)	
	۴۱≤	۳۷ (۳۳/۶)	۳۱ (۸۳/۸)	۱/۴۸(۰/۲۴–۸/۹۲)		۲۷ (۷۳/۰)	۲/ ۱۶(۰/۴۸–۹/۷۰)	
محل سکونت	روستایی	۶۸ (۶۱/۸)	۵۷ (۸۳/۸)	مرجع	۰/۱۲۶	۵۰ (۷۳/۵)	مرجع	۰/۶۵۱
	شهری	۴۲ (۳۸/۲)	۴۰ (۹۵/۲)	۳/۸۶(۰/۸۱–۱۸/۳۷)		۳۳ (۷۸/۶)	۱/۳۲ (۰/۵۳–۳/۲۹)	
سابقه درمان با گلوکانتیم	دارد	۲۲ (۲۰)	۱۰ (۴۵/۵)	مرجع	<۰/۰۰۱	۷ (۳۱/۸)	مرجع	<۰/۰۰۱
	ندارد	۸۸ (۸۰/۰)	۸۷ (۹۸/۹)	۱۰۴/۴(۱۲/۳–۸۸۹/۶)		۷۶ (۸۶/۴)	۱۳/۶(۴/۶–۴۰/۱)	
مدت زمان وجود زخم	کم‌تر از یک هفته	۵۸ (۵۲/۷)	۵۰ (۸۶/۲)	مرجع	۰/۲۴۰	۴۶ (۷۹/۳)	مرجع	۰/۰۱۱
	یک تا دو هفته	۲۹ (۲۶/۴)	۲۸ (۹۶/۶)	۴/۴۸(۰/۵۳–۳۷/۶۹)		۲۵ (۸۶/۲)	۱/۶۳(۰/۴۸–۵/۵۹)	
	بیش‌تر از دو هفته	۲۳ (۲۰/۹)	۱۹ (۸۲/۶)	۰/۷۶(۰/۲۰–۲/۸۲)		۱۲ (۵۲/۲)	۰/۲۸(۰/۱۰–۰/۸۰)	
محل ضایعه	دست	۵۴ (۴۹/۱)	۴۹ (۹۰/۷)	مرجع	۰/۷۲۴	۴۵ (۸۳/۳)	مرجع	۰/۰۸۱
	صورت	۳۲ (۲۹/۱)	۲۸ (۸۷/۵)	۰/۷۱(۰/۱۸–۲/۸۸)		۲۳ (۷۱/۹)	۰/ ۵۱(۰/۱۸–۱/۴۶)	
	پا	۱۵ (۱۳/۶)	۱۳ (۸۶/۷)	۰/۶۶(۰/۱۲–۳/۸۲)		۱۱ (۷۳/۳)	۰/۵۵(۰/۱۴–۲/۱۲)	
	سایر نواحی تنه	۹ (۸/۲)	۷ (۷۷/۸)	۰/۳۶(۰/۰۶–۲/ ۲۱)		۴ (۴۴/۴)	۰/۱۶(۰/۰۴–۰/۷۱)	

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-15]



تصویر شماره ۲: باند های حاصل از تست PCR بر روی نمونه های مشکوک به لیشمانیوز پوستی، چاهک شماره ۱ DNA Ladder، چاهک شماره ۲ کنترل منفی No Template Control، چاهک شماره ۳ کنترل مثبت لیشمانیا ماژور (MRHO/IR/75/ER) با طول باند ۳۵۰ جفت باز و چاهک شماره ۴ الی ۸ نمونه های مثبت و منفی مشکوک به لیشمانیوز پوستی

بحث

لیشمانیوز پوستی یکی از بیماری‌های مهم انگلی در مناطق اندمیک است و تشخیص آزمایشگاهی دقیق آن، به‌ویژه در مواردی که یافته‌های بالینی اختصاصیت کافی ندارند، از اهمیت زیادی برخوردار است(۱۸). در مطالعه حاضر، از مجموع ۱۱۰ نمونه افراد مشکوک به لیشمانیوز جلدی، ۹۷ نمونه (۸۸/۲ درصد) با روش PCR و ۸۳ نمونه (۷۵/۵ درصد) با بررسی مستقیم میکروسکوپی مثبت شدند. بنابراین، در جمعیت مورد مطالعه، تعداد نمونه‌های مثبت شناسایی شده با PCR بیش‌تر از روش میکروسکوپی بود. این یافته با مطالعات مقایسه‌ای پیشین همخوانی دارد. در مطالعه Shahbazi F و همکاران در مشهد، از ۱۵۵ نمونه مشکوک به لیشمانیوز پوستی، ۸۶ مورد با PCR مثبت شدند، در حالی که ۶۹ مورد با بررسی میکروسکوپی مثبت بودند، نویسندگان PCR را در مقایسه با روش‌های پارازیتولوژیک، روش تشخیصی با عملکرد بالاتر گزارش کردند(۱۹). همچنین، در مطالعه دیگری در شهر درگز، از ۹۴ بیمار مشکوک به لیشمانیوز پوستی مراجعه‌کننده به مراکز بهداشتی این شهر ۸۲ مورد (۸۷/۲ درصد) با میکروسکوپی مستقیم و ۸۵ مورد (۹۰/۴ درصد) با PCR مثبت شدند. مرور نظام‌مند و متاآنالیز Mesa و همکاران نیز نشان داد که روش‌های PCR از دقت تشخیصی بالایی در شناسایی *لیشمانیا* برخوردارند و این مزیت به‌ویژه در ضایعات مزمن یا دارای بار انگلی پایین اهمیت پیدا می‌کند(۲۰).

شناسایی موارد مثبت بیش‌تر توسط PCR نسبت به میکروسکوپی (McNemar's exact test, P<0.001) و توافق تنها متوسط بین دو روش(Cohen's kappa =۰/۵۸) را نمی‌توان به معنای غیرقابل اعتماد بودن میکروسکوپی تفسیر کرد؛ بلکه این یافته بیانگر آن است که دو روش مذکور، ابعاد متفاوتی از حضور انگل در ضایعه را ارزیابی می‌کنند. میکروسکوپی مستلزم مشاهده مستقیم آماستیگوت است، در حالی که PCR قادر به تشخیص مقادیر بسیار اندک DNA انگل، حتی در ضایعاتی با بار انگلی پایین یا مدت زمان طولانی‌تر از شروع بیماری می‌باشد(۲۱). این تفاوت می‌تواند بخش قابل توجهی از عدم توافق کامل مشاهده شده بین دو روش تشخیصی در مطالعه حاضر را توجیه نماید.

از نظر ویژگی‌های جمعیت شناختی، در مطالعه حاضر ۶۵/۵ درصد افراد مرد و ۳۴/۵ درصد زن بودند، اما ارتباط آماری معنی‌داری بین جنسیت و نتیجه PCR یا بررسی میکروسکوپی مشاهده نشد. غلبه مردان در میان افراد مبتلا یا مشکوک به لیشمانیوز جلدی در برخی مطالعات ایران نیز گزارش شده است(۲۲). برای مثال، در مطالعه اپیدمیولوژیک انجام شده در کاشان، ۵۸ درصد موارد مرد و ۴۲ درصد زن بودند؛ با این حال، نویسندگان نیز ارتباط معناداری بین جنسیت و بیماری مشاهده نکردند(۲۳). تفاوت در میزان مواجهه با ناقل، نوع فعالیت‌های روزانه و شغلی، پوشش بدن و میزان حضور در محیط‌های خارج از منزل می‌تواند از عوامل مؤثر بر تفاوت جنسیتی در مطالعات مختلف باشد(۲۴).

از نظر سنی، بیش‌ترین فراوانی افراد مورد مطالعه در گروه ۲۱ تا ۴۰ سال قرار داشت. با این حال، ارتباط

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-15]

آماری معنی داری بین گروه سنی و نتیجه PCR یا میکروسکوپی مشاهده نشد. این یافته از یک سو با مطالعاتی که توزیع قابل توجه لیشمانیوز را در جوانان و بزرگسالان گزارش کرده‌اند همخوانی دارد و از سوی دیگر نشان می‌دهد که الگوی سنی بیماری می‌تواند در مناطق مختلف متفاوت باشد. در مطالعه‌ای در استان همدان (غرب ایران)، بیش‌ترین فراوانی لیشمانیوز پوستی در گروه سنی ۲۰ تا ۲۹ سال گزارش شد، مطالعه‌ای دیگر در اهواز (جنوب‌غرب ایران) گروه سنی ۱۱ تا ۳۰ سال را به‌عنوان بیش‌ترین گروه در معرض این بیماری بیان کرده است(۲۵، ۲۶). این تفاوت‌ها می‌تواند ناشی از تفاوت در الگوی انتقال، شرایط محیطی و رفتاری و ساختار سنی جمعیت‌های مورد مطالعه باشد. در مطالعه حاضر، عدم وجود ارتباط معنادار سن با نتایج دو روش تشخیصی نشان می‌دهد که احتمال مثبت شدن آزمایش در گروه‌های سنی مورد بررسی تفاوت آماری قابل توجهی نداشته است.

در رابطه با محل سکونت، بیش‌تر افراد مطالعه حاضر در مناطق روستایی سکونت داشتند، اما بین محل سکونت و نتیجه PCR یا میکروسکوپی ارتباط آماری معناداری مشاهده نشد. اگر چه محیط‌های روستایی در برخی مناطق می‌توانند شرایط مناسبی برای حضور ناقل و مخازن بیماری فراهم کنند، اما انتقال لیشمانیوز به عوامل متعدد اکولوژیک و رفتاری وابسته است. علاوه بر این، جابه‌جایی افراد بین مناطق روستایی، شهری و مناطق اندمیک می‌تواند ارتباط ساده بین محل سکونت و ابتلا را کاهش دهد(۲۷). مطالعات اپیدمیولوژیک ایران نیز الگوهای متفاوتی از توزیع بیماری در مناطق شهری و روستایی نشان داده‌اند(۲۸). بنابراین، تفاوت در توزیع جغرافیایی بیماری میان مطالعات مختلف احتمالاً بازتاب تفاوت در شرایط اکولوژیک و اپیدمیولوژیک مناطق مورد مطالعه است.

یکی دیگر از یافته‌های مطالعه حاضر، ارتباط آماری معنادار سابقه درمان با گلوکانتیم بر نتیجه هر دو روش PCR و میکروسکوپی بود. در افراد دارای سابقه درمان ، تعداد موارد مثبت در هر دو روش کم‌تر از افراد فاقد سابقه درمان بود. در واقع تجویز ترکیبات آنتیموان پنج ظرفیتی مانند گلوکانتیم با کاهش بار انگلی در ضایعه همراه است، هرچند در برخی موارد ضایعه بالینی به‌طور کامل بهبود نمی‌یابد و بیمار همچنان مشکوک باقی می‌ماند. این امر لزوم ثبت دقیق فاصله زمانی و کامل‌بودن درمان قبلی را در مطالعات آینده برجسته می‌کند.

نتایج این مطالعه نشان دهنده وجود ارتباط معنادار بین مدت زمان وجود زخم و نتیجه بررسی مستقیم میکروسکوپی بود، در حالی که این ارتباط برای PCR مشاهده نشد. در مطالعه حاضر، تعداد موارد مثبت میکروسکوپی در ضایعات با مدت زمان کم‌تر کاهش یافت و در گروه دارای زخم بیش از دو هفته، تعداد موارد مثبت میکروسکوپی کم‌تر از گروه‌های دارای ضایعات کوتاه مدت بود. این موضوع می‌تواند با تغییر بار انگلی در طول تکامل ضایعه مرتبط باشد. از آنجا که بررسی میکروسکوپی به مشاهده مستقیم انگل در نمونه وابسته است، کاهش تعداد انگل قابل مشاهده یا تغییرات بافتی ضایعه در طول زمان می‌تواند احتمال شناسایی را تحت تأثیر قرار دهد. در مقابل، PCR با شناسایی DNA انگل می‌تواند در شرایطی که مشاهده مستقیم انگل دشوارتر است، همچنان قابلیت شناسایی داشته باشد. مرور نظام‌مند Mesa و همکاران نیز بر ارزش روش‌های مولکولی در ضایعات مزمن و دارای بار انگلی پایین تأکید کرده است(۲۰).

از نظر محل ضایعه، در مطالعه حاضر بیش‌ترین فراوانی ضایعات مربوط به دست‌ها بود و پس از آن صورت، پا و سایر نواحی تنه قرار داشتند. این یافته با مطالعات اپیدمیولوژیک انجام شده در ایران مطابقت دارد(۲۹). این الگو را می‌توان تا حدی با قرار گرفتن بیش‌تر دست‌ها و سایر نواحی بدون پوشش در معرض گزش ناقل توضیح داد. با این حال، در مطالعه حاضر

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-15]

محل ضایعه با نتیجه PCR یا بررسی میکروسکوپی ارتباط آماری معنی‌داری نداشت.

تفاوت میان یافته‌های مطالعه حاضر و برخی مطالعات پیشین احتمالاً تا حدی به تفاوت در طراحی مطالعات، حجم نمونه، ویژگی‌های جمعیت مورد بررسی، منطقه جغرافیایی، گونه *لیشمانیا* و روش تشخیصی مورد استفاده مربوط است. یکی از نقاط قوت مطالعه حاضر، مقایسه همزمان روش مولکولی و بررسی مستقیم میکروسکوپی در یک جمعیت واحد از افراد مشکوک به لیشمانیوز پوستی و بررسی ارتباط نتایج این دو روش با متغیرهای دموگرافیک و بالینی است.

از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به عدم دسترسی به یک استاندارد طلایی مستقل (نظیر کشت یا پیگیری بالینی بیماران) اشاره کرد که به دلیل آن امکان محاسبه حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی وجود نداشت و یافته‌ها صرفاً بر پایه میزان توافق بین دو روش (ضریب کاپای کوهن و آزمون مک‌نمار) استوار است؛ از این رو مثبت شدن PCR یا میکروسکوپی نباید به‌معنای تأیید قطعی عفونت فعال تلقی شود. از دیگر محدودیت‌های مطالعه، عدم تعیین گونه انگل لیشمانیا بود که امکان بررسی ارتباط گونه انگل با عملکرد تشخیصی یا ویژگی‌های بالینی ضایعه را فراهم نکرد. همچنین عدم ثبت داده‌های تکمیلی بالینی نظیر اندازه دقیق ضایعه، تعداد ضایعات، و جزئیات درمان قبلی، از دیگر محدودیت‌های این مطالعه محسوب می‌شود. مطالعات آینده با استاندارد مرجع مستقل، تعیین گونه انگل، و همچنین تحلیل های چند متغیره می‌توانند به تکمیل این یافته‌ها کمک کنند.

در مجموع، PCR می‌تواند به‌عنوان روشی مکمل، به‌ویژه در موارد بالینی مشکوک با نتیجه میکروسکوپی منفی یا در بیمارانی با سابقه درمان قبلی که احتمال کاهش بار انگلی در آن‌ها بیش‌تر است، در مراکزی که امکانات آزمایشگاهی و تجهیزات مولکولی لازم را دارند مورد توجه قرار گیرد. با این حال، استفاده از PCR به‌عنوان روش روتین، نیازمند انجام مطالعات بیش‌تر و گسترده‌تر می‌باشد.

سپاسگزاری

این مطالعه حاصل طرح پژوهشی است. بدین وسیله از کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی مازندران به جهت حمایت مالی این طرح تقدیر و تشکر به عمل می آید. نویسندگان اذعان می‌کنند که از ابزارهای مبتنی بر هوش مصنوعی جهت کمک به نگارش بهتر و صحیح‌تر مطالب علمی استفاده گردیده است. تمامی محتوای علمی اعم از طراحی، آنالیز و نتیجه گیری توسط نویسندگان انجام شده است.

References

1- Suschinel R, Jaimes-Mogollón AL, Gutiérrez-Marín R, Peña-Cortés LC, Mendoza-Ibarra JA, Flórez-Gélvez J, etal. Challenges during the realization of an international research project on leishmaniasis in Colombia. Front Public Health 2023;11:1143939.

2- Dostálová A, Volf P. Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. Parasit Vectors 2012;5:276 PMID: 23206339.

3- Dos Santos Meira C, Gedamu L. Protective or Detrimental? Understanding the Role of Host Immunity in Leishmaniasis. Microorganisms 2019;7(12):695 PMID: 31847221.

4- Jalali H, Enayati AA, Fakhar M, Motevalli-Haghi F, Yazdani Charati J, Dehghan O, etal. Reemergence of zoonotic cutaneous leishmaniasis in an endemic focus, northeastern Iran. Parasite Epidemiol Control 2021;13:e00206 PMID: 33889761.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-15]

5- Aflatoonian MR, Sharifi I, Aflatoonian B, Bamorovat M, Heshmatkhah A, Babaei Z, etal. Associated-risk determinants for anthroponotic cutaneous leishmaniasis treated with meglumine antimoniate: A cohort study in Iran. PLoS Neglected Tropical Diseases 2019;13(6):e0007423.

6- Salimi M, Saghafipour A, Hamidi Parsa H, Khosravi M, Shirzadi MR. Economic burden evaluation of cutaneous leishmaniasis in Iran. Shiraz E-Med J. 2019;20(6):e82810.doi:10.5812/semj.82810

7- de Vries HJC, Schallig HD. Cutaneous Leishmaniasis: A 2022 Updated Narrative Review into Diagnosis and Management Developments. Am J Clin Dermatol 2022;23(6):823-840 PMID: 36103050.

8- Eskandari SE, Memariani M, Memariani H, Mohebali M, Khamesipour A. Molecular Diagnosis of Human Cutaneous Leishmaniasis and Identification of the Causative Leishmania Species in Iran: A Narrative Review. Iran Biomed J 2024;28(4):148-155 PMID: 39275812.

9- Rihs JB, Vilela MT, Dos Santos JSC, Caldas S, Leite RS, Mol MPG. Exploring real-time PCR techniques for diagnosing leishmaniasis: key insights from a systematic review. Parasitol Res 2025;124(5):54 PMID: 40397177.

10- Gurel MS, Tekin B, Uzun S. Cutaneous leishmaniasis: A great imitator. Clin Dermatol 2020;38(2):140-151 PMID: 32513395.

11- Heidari A, Dashtaki NM, Mizbani S, Rejali M, Maracy MR. Residential environment, human behavior and socio-economic status in transmission of cutaneous leishmaniasis in central Iran. Scientific Reports 2025;15(1):7271.

12- Sabzevari S, Teshnizi SH, Shokri A, Bahrami F, Kouhestani F. Cutaneous leishmaniasis in Iran: A systematic review and meta-analysis. Microb Pathog 2021;152:104721 PMID: 33539962.

13- de Vries HJC, Schallig HD. Cutaneous Leishmaniasis: A 2022 Updated Narrative Review into Diagnosis and Management Developments. Am J Clin Dermatol 2022;23(6):823-840 PMID: 36103050.

14- Arnau A, Abras A, Ballart C, Fernández-Arévalo A, Torrico MC, Tebar S, etal. Evaluation of the Diagnostic Sensitivity of the VIASURE Leishmania Real-Time PCR Detection Kit Prototype for the Diagnosis of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis. Transboundary and Emerging Diseases 2023;2023:1172087.

15- Organization WH. Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010. WHO Technical Report Series ed. Geneva: World Health Organization; 2010.

16- el Tai NO, Osman OF, el Fari M, Presber W, Schönian G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of Leishmania donovani spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. Trans R Soc Trop Med Hyg 2000;94(5):575-579 PMID: 11132393.

17- Mouttaki T, Morales-Yuste M, Merino-Espinosa G, Chiheb S, Fellah H, Martin-Sanchez J, etal. Molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis and identification of the causative Leishmania species in Morocco by using three PCR-based assays. Parasit Vectors 2014;7:420 PMID: 25189460.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-15]

18- Reimão JQ, Coser EM, Lee MR, Coelho AC. Laboratory Diagnosis of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis: Current and Future Methods. Microorganisms 2020;8(11):1632 PMID: 33105784.

19- Shahbazi F, Shahabi S, Kazemi B, Mohebali M, Abadi A, Zarei Z. Evaluation of PCR assay in diagnosis and identification of cutaneous leishmaniasis: A comparison with the parasitological methods. Parasitology Research 2008;103:1159-1162.

20- Mesa LE, Manrique R, Muskus C, Robledo SM. Test accuracy of polymerase chain reaction methods against conventional diagnostic techniques for Cutaneous Leishmaniasis (CL) in patients with clinical or epidemiological suspicion of CL: Systematic review and meta-analysis. PLoS Negl Trop Dis 2020;14(1):e0007981 PMID: 31961871.

21- Mesa LE, Manrique R, Muskus C, Robledo SM. Test accuracy of polymerase chain reaction methods against conventional diagnostic techniques for Cutaneous Leishmaniasis (CL) in patients with clinical or epidemiological suspicion of CL: Systematic review and meta-analysis. PLoS Negl Trop Dis 2020;14(1):e0007981 PMID: 31961871.

22- Feiz Haddad MH, Kassiri H, Kasiri N, Panahandeh A, Lotfi M. Prevalence and epidemiologic profile of acute cutaneous leishmaniasis in an endemic focus, Southwestern Iran. Journal of Acute Disease 2015;4(4):292-297.

23- Moein D, Masoud D, Mahmood N, Abbas D. Epidemiological Trend of Cutaneous Leishmaniasis in an Endemic Focus Disease During 2009-2016, Central Iran. Turkiye Parazitol Derg 2019;43(2):55-59 PMID: 31204455.

24- Wenning B, Price H, Nuwangi H, Reda KT, Walters B, Ehsanullah R, etal. Exploring the cultural effects of gender on perceptions of cutaneous leishmaniasis: a systematic literature review. Glob Health Res Policy 2022;7(1):34 PMID: 36163191.

25- Akhlagh A, Salehzadeh A, Zahirnia AH, Davari B. 10-Year Trends in Epidemiology, Diagnosis, and Treatment of Cutaneous Leishmaniasis in Hamadan Province, West of Iran (2007–2016). Front Public Health 2019;7 :27.

26- Khademvatan S, Salmanzadeh S, Foroutan-Rad M, Bigdeli S, Hedayati-Rad F, Saki J, etal. Spatial distribution and epidemiological features of cutaneous leishmaniasis in southwest of Iran. Alexandria Journal of Medicine 2017;53(1):93-98.

27- Yohannes T, Beyene G, Geltore TE, Geleta D, Mekonnen Z. Community knowledge, attitudes, and practices toward cutaneous leishmaniasis in central Ethiopia. PLoS Neglected Tropical Diseases 2026;20(1):e0013838.

28- Nasiri Z, Kalantari M, Mohammadi J, Daliri S, Mehrabani D, Azizi K. Cutaneous leishmaniasis in Iran: A review of epidemiological aspects, with emphasis on molecular findings. Parasite 2022;29:47 PMID: 36269100.

29- Mohebali M, Darabi H, Hajjaran H, Shirzadi MR, Fouladvand M, Charehdar S, etal. Molecular and parasitological study of cutaneous leishmaniasis in Bushehr province, southwest of the Islamic Republic of Iran: a cross-sectional study during 2009-2012. J Parasit Dis 2015;39(3):371-376 PMID: 26345037.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-15]