

Current and Novel Laboratory Diagnostic Methods and Identification of Causative Agents for Cutaneous Leishmaniasis

Hossein Pazoki-ghohe¹,
Beheshteh Haghparast-kenari¹,
Mahdi Fakhar²

¹ MSc in Parasitology, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Associate Professor, Department of Parasitology, Molecular and Cell Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received February 30, 2014 ; Accepted August 29, 2015)

Abstract

Cutaneous leishmaniasis (CL) annually imposes high socio-economic burdens on societies. Although among diagnostic methods, microscopic and or culture methods are considered as golden standard due to their high specificity, but their sensitivities are variable. Today, present microscopic method is considered as the most valid and available method for diagnosis of CL. However, different methods with higher sensitivities are introduced for diagnosis of this disease amongst which improved micro culture has high specificity (100%) and sensitivity (98.4%). Moreover, among other diagnostic methods, various molecular and biochemical methods are developed for detection and characterization (typing) of *Leishmania* spp. Study of isoenzyme profiles (zymodemes) is considered as golden standard for typing and microsatellite is suggested as an alternative method. Recently, novel methods such as LAMP isothermal technique with high specificity, NASBA and HRM are also evaluated. The current study provides a more detailed overview of novel and routine diagnostic methods for cutaneous leishmaniasis.

Keywords: cutaneous leishmaniasis, microscopic methods, microculture, molecular methods, zymodem

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(132): 345-361(Persian).

روش های رایج و نوین تشخیص آزمایشگاهی و شناسایی عوامل لیشمانیوز پوستی

حسین پازوکی قوهه^۱

بهشته حق پرست کناری^۱ مهدی فخار^۲

چکیده

بیماری لیشمانیوز پوستی سالانه عوارض اقتصادی-اجتماعی بسیاری بر جوامع بشری تحمیل می کند. در میان روش های تشخیصی، روش های میکروسکوپی و یا کشت به عنوان روش های استاندارد طلایی مطرح هستند که هرچند ویژگی بالایی دارند اما از حساسیت متفاوتی برخوردارند. در حال حاضر روش معمول میکروسکوپی به عنوان معتبرترین و در دسترس ترین روش برای تشخیص لیشمانیوز پوستی در نظر گرفته می شود. روش های مختلفی با حساسیت بالاتر برای تشخیص این بیماری معرفی شده اند. در این میان می توان به روش میکروکالچر اصلاح شده اشاره نمود که دارای حساسیت ۹۸/۴ درصد و ویژگی ۱۰۰ درصد می باشد. در میان سایر روش ها، روش های مولکولی و بیوشیمیایی متنوعی برای شناسایی و تعیین هویت (تایپینگ) انگل لیشمانیا طراحی شده اند که روش بررسی الگوهای ایزوآنزیمی (زایمودم ها) به عنوان استاندارد طلایی تایپینگ و روش جایگزین آن روش میکروستلایت پیشنهاد شده است. اخیراً روش های نوینی مانند روش های تک دمایی LAMP با ویژگی بالا و یا NASBA و HRM نیز مورد ارزیابی قرار گرفته اند. در مقاله حاضر، روش های تشخیصی رایج و نوین لیشمانیوز پوستی با جزئیات بیشتر مرور شده اند.

واژه های کلیدی: لیشمانیوز پوستی، روش های میکروسکوپی، میکروکالچر، مولکولی، زایمودم

مقدمه

است (۲). این بیماری یکی از مهم ترین و شایع ترین بیماری های بومی ایران و دومین بیماری انگلی منتقله توسط حشرات بعد از مالاریا می باشد. دو فرم شایع لیشمانیوز پوستی در ایران عبارتند از نوع شهری و نوع روستایی که هر کدام از این دو نوع دارای کانون های متعددی در کشور می باشند (۳، ۴). شکل تیبیک لیشمانیوز پوستی به صورت پاپول، ندول پوسته سخت، پلاک یا ندول زخم شده ظاهر می شود و اشکال

لیشمانیوز پوستی یک بیماری انگلی است که توسط تک یاخته جنس لیشمانیا ایجاد می شود و بسته به گونه های آن و پاسخ ایمنی میزبان اشکال بالینی مختلفی ایجاد می کند. انتقال بیماری از طریق گزش پشه خاکی ماده آلوده (زیر خانواده فلبوتومینه) اتفاق می افتد. زخم ها اغلب در قسمت های بدون پوشش بدن ایجاد می شوند (۱). این بیماری گسترش جهانی دارد و بیشتر در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان و کشورهای حوزه مدیترانه شایع

E-mail: mahdif53@yahoo.com

مؤلف مسئول: مهدی فخار - ساری: کیلومتر ۱۸ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی

۱. کارشناس ارشد انگل شناسی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 ۲. دانشیار، گروه انگل شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
- تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۱۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۳/۳/۱۷ تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۶/۷

۱- روش های تشخیص آزمایشگاهی
 ۱-۱ روش های پارازیتولوژیکی (انگل شناسی)
 الف- روش تهیه گسترش مستقیم (Direct smear)
 تشخیص لیشمانیوز پوستی (CL) معمولاً با آزمایش مستقیم نمونه های حاصل از خراشیدن کف زخم (پس از ایجاد شکاف در حاشیه پوست) یا کشیدن مایع سرروزینه داخل ضایعات پوستی [Fine needle aspiration(FNA)] و بیوپسی ضایعات پوستی انجام می شود. اگر ضایعه مزمن باشد، چون ضایعات معمولاً خود محدود شونده هستند، برای مشاهده انگل کمی دیر شده است و معمولاً اگر ضایعه دارای یک حاشیه قرمز فعال باشد نمونه گیری مناسب تر است. نمونه گیری از ضایعه مشکوک باید با آسپیراسیون و خراشیدن (هر دو به طور مستقیم از زخم) و یا بیوپسی (معمولاً با یک ابزار بیوپسی مثل پانچر ۴ میلی متری) توسط افراد با تجربه انجام شود. در غیر این صورت، نتایج ضعیف و بیمار دچار عوارض خواهد شد. در میان روش های مذکور، بیوپسی مناسب ترین روش است اما از بعضی ضایعات (روی انگشت، گوش یا صورت) نمی توان بیوپسی گرفت که باید از آسپیره نمودن و یا خراشیدن استفاده نمود. معمولاً باید دو بیوپسی ۴ میلی متری به طور استاندارد از بخش ندولار یا حاشیه برآمده ضایعه تهیه شود. معمولاً با تزریق داروی لیدوکائین ۲ درصد حاوی آدرنالین، قبل از برداشت بیوپسی، از خونریزی

غیر تیپیک این خصوصیات را نداشته و ممکن است با سایر بیماری های پوستی اشتباه شوند (۵،۶). لیشمانیوز باید جزء تشخیص افتراقی زخم های مزمن پوستی در افراد با سابقه مسافرت به مناطق اندمیک قرار گیرد (۱). با علایم بالینی نمی توان ابتدا به لیشمانیوز پوستی را تایید نمود (۷). در کشورهای اندمیک و غیر اندمیک زخم های ابتدایی لیشمانیوز پوستی در اغلب موارد با سایر بیماری های پوستی از جمله زخم های گرمسیری، زرد زخم، گزش حشرات آلوده، جذام، لوپوس ولگاریس، مرحله سوم سیفلیس، بیماری اسپیروکتی یاز (Yaws)، بلاستومایکوزیس، پاراکوکسیدئوئیدومایکوزیس، توپرکلوزیس پوستی، اسپوروتریکوزیس پوستی، مایکوباکتریوزیس غیر تیپیک و سرطان پوست اشتباه می شوند (۷، ۸). تشخیص نادرست و یا با تاخیر ممکن است باعث گسترش ضایعه، مقاومت دارویی و عوارض جبران ناپذیری (روانی، اجتماعی و اقتصادی) شود (۹). بنابراین، هنگامی که به لیشمانیوز پوستی مشکوک شدیم، برای تشخیص صحیح و زودرس علاوه بر شک بالینی و سابقه اپیدمیولوژیکی، استفاده از روش های تشخیص آزمایشگاهی ضروری است (۱۰). در مقاله حاضر انواع روش های تشخیصی و تعیین هویت عوامل ایجاد کننده لیشمانیوز پوستی مرور شده است که شامل روش های پارازیتولوژی، ایمونولوژی، مولکولی، بیوشیمیایی و روش های نوین می باشند (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: حساسیت و ویژگی روش های مختلف تشخیص و شناسایی عوامل لیشمانیوز پوستی

منبع	ویژگی (درصد)	حساسیت (درصد)	نوع آزمون	انواع روش های تشخیصی
۱۰،۱۲،۱۵	۱۰۰	۶۴-۸۸/۸	گسترش مستقیم	روش های پارازیتولوژیکی
۸،۱۵	۱۰۰	۴۰-۸۴	کشت	
۱۲،۲۰	۱۰۰	۸۳/۳-۱۰۰	میکروکالچر	
۵۸،۲۲،۲۳	-	۶۸		روش های هیستولوژیکی
				روش های ایمونولوژی
۲۶	۹۰،۷-۹۶	۸۱-۹۳،۳	IgG-ELISA	۱- شناسایی آنتی بادی
۷،۳۱	۹۵		IFA	۲- شناسایی آنتی ژن
۸	-	۹۰	افزایش حساسیت تاخیری	۳- آزمون پوستی
				روش های مولکولی
۱۵،۳۹،۴۸،۴۹،۵۲	۱۰۰	۹۲-۱۰۰	PCR	
۵۳،۵۱	۸۰،۶	۲۷-۸۵	PCR-RFLP	
۵۳	-	۹۴/۴-۸۳/۳	PCR-FFL	
۵۹	-	۹۸	RT-LAMP	
۶۶-۶۸	۱۰۰		HRM	

۱ انگل در هر واکنش یا ۱۰ انگل در میلی لیتر از نمونه

جلوگیری می شود. در هنگام نمونه گیری از ترکیبات حاوی ید مانند بتادین، به دلیل اختلال در انجام PCR، نباید استفاده شود. برای تهیه گسترش های تماسی (Impression smear)، یکی از بیوپسی ها باید نصف و سطح تازه برش به طور محکم روی لام فشار داده شود. اگر نتایج نمونه اول منفی شد و ضایعه پیشرفت نمود و یا بهبود نیافت، نمونه گیری باید تکرار شود (۱، ۲، ۵، ۷، ۸، ۱۰). برای تهیه گسترش مستقیم می توان از تیغ بیستوری کند، لانست سر کند و Dental broaches (نوعی ابزار در دندانپزشکی) نیز استفاده نمود (۱۱).

گسترش ها بعد از خشک شدن در دمای آزمایشگاه و فیکس نمودن با متانول خالص با رنگ های رومانوفسکی مانند گیمسا (ترجیحاً رقیق شده با بافر دارای PH=7.2) رنگ آمیزی می شوند. با این رنگ سیتوپلاسم انگل به رنگ آبی کم رنگ، هسته و کیتوپلاست به رنگ صورتی- بنفش مشاهده می شود (۷). در زیر میکروسکوپ نوری اجسام لیشمن که ۴-۲ میکرومتر و گرد و یا بیضی هستند معمولاً در ماکروفاژها دیده می شوند، ولی در خارج از ماکروفاژ نیز ممکن است مشاهده شوند. حساسیت این روش ۸۸/۸-۶۴ درصد و ویژگی آن ۱۰۰ درصد گزارش شده است (۱۰، ۱۲) که به عواملی از قبیل مدت زمان صرف شده برای هر اسمیر، مهارت فرد بررسی کننده و حاد یا مزمن بودن ضایعه بستگی دارد. بر اساس مطالعه Ranawaka و همکاران (۲۰۱۳) در سریلانکا، به نظر می رسد که تشخیص بالینی ضایعات تیپیک CL توسط متخصص پوست، در مناطق اندمیک، قابل قبول باشد (۱۳). هم چنین آن ها می توانند با استفاده از یک ابزار کاربردی و غیر تهاجمی تشخیصی به نام فتوگرافی در روش در موسکوپ (Dermoscopy) و مشاهده ساختارهایی که اختصاصی ضایعات پوستی CL می باشند، از جمله اشکال سفید رنگ ستاره ای شکل در نمونه پوست فرد مبتلا که به White starburst-like معروف است و یا مشاهده ساختار بیضی شکل به رنگ ماهی سالمون که به آن Salmon-colored ovoid گفته

می شود، بیماری لیشمانیوز پوستی را تشخیص دهند (۹). علاوه بر این، اخیراً تکنیک Confocal microscopy (میکروسکوپ هم کانون) به عنوان یک روش تشخیصی غیر تهاجمی در بررسی بافت پوست آلوده به انگل لیشمانیا معرفی شده است. این میکروسکوپ از انواع میکروسکوپ های فلورسانس با منبع نوری لیزر است و ابزاری مفید برای به دست آوردن تصاویر سه بعدی با کیفیت بالاست. خصوصیت این میکروسکوپ توانایی آن در ایجاد تصاویر بدون کدورت از نمونه های ضخیم در عمق های مختلف است (۱۴).

ب- روش کشت (Culture method): قبل از نمونه گیری برای کشت، ضایعه و پوست اطراف آن با الکل اتانول ۷۰ درصد ضد عفونی می شوند و بعد از خشک شدن نمونه گیری انجام می گیرد (۱۵). نمونه های به دست آمده از خراشیدن، بیوپسی و آسپیره نمودن برای کشت استفاده می شوند. بعضی از گونه های لیشمانیا را به سختی می توان در محیط های کشت جدا کرد. محیط های Brain-heart infusion (BHI)، Novy-MacNeil-Nicole (NNN)، Grace's، Evan's Modified Tobie's (EMTM) کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (۱۶) و ممکن است از محیط Schneider's Drosophila نیز استفاده شود. تشخیص لیشمانیوز پوستی با روش کشت به ۳۰-۵ روز زمان نیاز دارد (۱۷). حساسیت کشت نسبت به تعداد و پراکنندگی انگل در نمونه های حاصل از بیوپسی، مهارت نمونه گیر و نوع محیط کشت استفاده شده متغیر است (۱۸). ویژگی حدود ۱۰۰ درصد، اما حساسیت براساس مطالعات مختلف بین ۸۴-۴۰ درصد متفاوت است (۸). کشت انگل مزایای زیادی دارد. برای مثال، در تعیین ژنوتایپ، شناسایی گونه ها و بررسی مقاومت دارویی استفاده می گردد (۱۹). Allahverdiyev و همکاران (۲۰۰۴) در ترکیه یک روش کشت میکروکپیلاری [Microcapillary Culture Method (MCM)] برای تشخیص CL معرفی کرده اند. این روش در مقایسه با

کشت رایج، سریع، ساده و مقرون به صرفه است و حساس تر از گسترش‌ها و روش کشت رایج برای تشخیص CL می‌باشد (۲۰). با این وجود، روش MCM یک روش تهاجمی است و رضایت ناکافی بیماران در هنگام نمونه‌گیری را در پی دارد. در این روش نمونه‌ها با استفاده از سرسوزن ۲۶ درجه و سرنگ و تزریق نرمال سالین و سپس آسپیره نمودن آن تهیه می‌شود که باعث نارضایتی بیماران می‌گردد. از اینرو پقه و همکاران (۲۰۱۴) یک روش میکروکالچر اصلاح شده [Improved Microculture Method (IMM)] بدون استفاده از نیدل و سرنگ را به عنوان یک روش غیرتهاجمی و مقایسه شده با اسمیر و PCR در تشخیص CL معرفی کردند. این روش دارای حساسیت ۹۸/۴ درصد و ویژگی ۱۰۰ درصد می‌باشد. در مطالعه مذکور، با توجه به میزان تطابق بالا میان IMM و PCR و هم‌چنین مزایای دیگری از قبیل سادگی، سرعت و حساسیت کافی این روش، IMM به عنوان یک روش جایگزین تشخیصی با ارزش برای PCR در تشخیص CL پیشنهاد شده است. در مجموع، پقه و همکاران IMM را به عنوان یک تست تأییدی برای تشخیص دقیق و معتبر CL برای بیماران به ویژه بیماران با اسمیر منفی در مناطق اندمیک پیشنهاد کرده اند (۱۲).

ج- روش تلقیح به حیوان حساس آزمایشگاهی: تزریق به حیوانات بیش‌تر در بررسی میزان عفونت‌زایی انگل و در کارهای تحقیقاتی از جمله مطالعات دارویی، ایمنی‌زایی و ارزیابی واکسن استفاده می‌شود و به عنوان یک روش تشخیصی مهم مطرح نیست زیرا به هفته‌ها یا ماه‌ها زمان نیاز دارد. حیوان مناسب برای مطالعه بر روی عوامل ایجادکننده لیشرمانیوز پستی موش Balb/c می‌باشد (۲۱).

۱-۲. روش‌های هیستولوژیک (بافت شناسی)

بیوپسی‌های پوست باید از حاشیه فعال پوست گرفته شوند. اگرچه ممکن است از یک پانچ ۴ میلی‌متری استفاده شود، اما بیوپسی گرفته شده با اسکالپل ارجح

است. در بیش‌تر موارد بررسی هیستوپاتولوژی بافت‌های رنگ شده با هماتوکسیلین اتوزینه عنوان یک روش تأیید تشخیص بیماری می‌باشد. هیستوپاتولوژی CL دارای تنوع زیادی است، اما یک الگوی غالب با حضور گرانولومای بدون نکروز را نشان می‌دهد (۸). براساس مطالعه آینده‌نگر Uthman و همکاران (۲۰۰۵) در عربستان سعودی ممکن است چهار حالت مجزا مشاهده شود (۲۲). نوع A که ماکروفاژها به شدت آلوده و واکنش با لئوسیت‌های کم است. این نوع مرتبط با یک پاسخ ایمنی اولیه یا یک لیشرمانیوز پستی منتشر آنژیوتیک است. نوع B و C یک پاسخ التهابی همراه با یا بدون نکروز است و بیش‌ترین انواع را در CL دنیای قدیم شامل می‌شوند. در نهایت، نوع D با گرانولوم توبرکلوئیدی و همراه با تعداد کم انگل یا بدون انگل مرتبط با شکل‌های مزمن مانند لیشرمانیوز لوپوئید یا مرحله انتهایی ترمیم خود به خودی شناسایی می‌شود (۸). حساسیت روش هیستوپاتولوژی در اشکال تیپیک CL، ۷۰ درصد و در فرم غیر تیپیک، ۴۲ درصد و ویژگی آن ۱۰۰ درصد است. باید توجه داشت که روش‌های سیتولوژی و پاتولوژی حساسیت کافی برای تشخیص اشکال غیر تیپیک CL را ندارند (۵). حساسیت روش سیتولوژی در فرم تیپیک CL، ۷۹ درصد و در فرم غیر تیپیک، ۵۸ درصد و ویژگی آن ۱۰۰ درصد است. این روش ارزان، آسان و دارای حساسیت بالا است (۵). قابل ذکر است که روش سیتولوژی [Fine Needle Aspiration (FNA)] نیز به عنوان یک روش معتبر برای تشخیص لیشرمانیوز پستی معرفی شده است (۲۳).

۱-۳. روش‌های ایمونولوژیک

الف - شناسایی آنتی‌بادی (Antibody detection):

اگرچه روش‌های سرولوژی مختلفی معرفی شده‌اند اما به‌طور کلی در لیشرمانیوز پستی و پوستی - مخاطی به علت پاسخ ضعیف ایمنی هومورال و در نتیجه تولید کم آنتی‌بادی‌ها روش‌های سرولوژی کاربرد زیادی ندارند.

از سوی دیگر، معایبی هم چون واکنش های متقاطع و عدم تفکیک عفونت فعلی از عفونت قبلی و عدم توانایی تشخیص گونه انگل بر کم اهمیت بودن این روش می افزاید (۷). ایمونوفلورسانس غیر مستقیم و الیزا از روش های سرولوژی رایج تر می باشند، اما این روش ها در تشخیص لیشمانیوز پوستی، در دنیای قدیم به علت حساسیت کم و واکنش متقاطع با دیگر عفونت ها، از روش های رایج نیستند. در واقع، این روش ها (به ویژه IFA) ممکن است محدودیت هایی مانند عیار کم آنتی بادی و یا عدم شناسایی آن، یا غیر قابل جداسازی آنتی بادی، عدم تفکیک عفونت حاد از مزمن و همچنین حضور واکنش متقاطع با دیگر گونه ها را ایجاد نمایند. نتایج مثبت کاذب در بیماران مبتلا به تریانوزومیازیس، توکسوپلاسموزیس یا پاراکوکسیدیوئیدومایکوزیس و حتی در افراد سالم دیده شده است (۸). این محدودیت ها منجر به گسترش روش های جدید ایمونولوژی برای شناسایی آنتی بادی مانند فلوسایتومتري، وسترن بلات و الیزا شدند (۲۴، ۲۵). نتایج مطالعه Skraba و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد که Igg-ELISA در تشخیص لیشمانیوز پوستی - مخاطی، از افراد سالم، بیماران با توکسوپلاسموزیس، پاراکوکسیدیوئیدومایکوزیس، سیفلیس، توبرکلوزیس و جذام، به جز در بیماری شاگاس، دارای حساسیت ۹۳/۳ درصد و ویژگی ۹۰/۸ درصد می باشد. حساسیت و ویژگی مناسب این روش نشان دهنده قابل استفاده بودن آن در تشخیص این بیماری، به علاوه در بررسی های سرواپیدمیولوژیکی، و پیگیری بیماران درمان شده می باشد (۲۶). هم چنین Celeste روش ELISA-L.infantum-rHsp83 را به علت حساسیت و ویژگی بالا و واکنش متقاطع ناچیز با دیگر بیماری های عفونی به عنوان یک روش سرولوژی برای تایید تشخیص عفونت لیشمانیا پیشنهاد کرد (۲۷). ارزیابی anti-fixed (AFPA-IgG) و anti-live (ALPA-IgG) *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigote IgG با فلوسایتومتري از سرم بیماران

[localized cutaneous leishmaniasis (LCL)] توسط Pereira و همکاران، این روش را برای تشخیص و پیگیری بعد از درمان بیماران LCL به عنوان روش سرولوژیکی مفید معرفی کرد (۲۸). در مطالعه Pomares و همکاران (۲۰۱۲)، وسترن بلات علیه آنتی ژن 14kDa و 18kDa لیشمانیا در بیماران مبتلا به لیشمانیوز پوستی نشان داد که این روش ابزاری غیر تهاجمی برای تشخیص بیماری ایجاد شده توسط لیشمانیا مازور می تواند باشد (۲۹). هم چنین آنزیم های Fe-SOD خالص مترشح به وسیله لیشمانیا پروویانا و لیشمانیا آمازوننسیس به عنوان آنتی ژن در تشخیص سرمی بیماران لیشمانیوز پوستی با روش الیزا و وسترن بلات به کار رفته است که حساسیت و اختصاصیت قابل قبولی داشته اند (۳۰).

ب - شناسایی آنتی ژن (*Antigen detection*): این روش نسبت به روش های شناسایی آنتی بادی اختصاصی تر است و دارای خصوصیتی همچون تشخیص زودرس بیماری، عدم واکنش های متقاطع و استفاده در افراد با نقص و یا ضعف ایمنی مانند افراد مبتلا به ایدز می باشد (۳۱). در روش فلورسانس آنتی بادی مستقیم (*Direct Fluorescent Antibody*) برای شناسایی آنتی ژن انگل در مقاطع بافتی و یا گسترش ها از آنتی بادی کونژوگه با رنگ فلورسنت به عنوان ردیاب (*probe*) استفاده می شود. این روش در تشخیص لیشمانیوز پوستی، پوستی - مخاطی و لیشمانیوز پوستی پس از کالآزار (PKDL) مناسبتر است. به جای رنگ فلورسنت از [*Horse Radish Peroxidase (HRP)*] می توان برای اتصال به آنتی بادی استفاده کرد که در این صورت به میکروسکوپ فلورسانس نیاز نخواهد داشت و اسلایدهای رنگ شده می توانند برای مدت طولانی نگهداری شوند (۷).

ج - *آزمون پوستی (Skin testing)*: از دیاد حساسیت تاخیری یک ویژگی مهم اشکال لیشمانیوز پوستی است و با آزمون پوستی لیشمانین (LST) اندازه گیری می شود که نام دیگر آن واکنش مونته نگرو می باشد. این آزمون

لیشمانیوز پوستی منتشر (DCL)، عفونت توام ایدز و لیشمانیوز منفی خواهد شد.

۲- روش های شناسایی انگل لیشمانیا

۲-۱. روش های مولکولی

روش های مولکولی به ویژه در موارد تراکم کم انگل و ضایعات غیر تیپیک قابل اشتباه با سایر عفونت ها بسیار با ارزش بوده و ویژگی و حساسیت آن ها بیش از ۹۵ درصد است. باید به این نکته توجه داشت که اگرچه روش های مولکولی مختلفی برای تشخیص و شناسایی گونه های لیشمانیا معرفی شده اند، اما این روش ها به خاطر پرهزینه بودن و نیاز به پرسنل با تجربه و تجهیزات پیشرفته زیاد مورد استفاده قرار نمی گیرند (۳۵-۳۳). لیشمانیوز پوستی مزمن اغلب به صورت غیر تیپیک بروز می کند و به آسانی با سایر زخم های مزمن اشتباه می شود. این بیماران اغلب دارای تیترا کم یا بدون آنتی بادی می باشند. بنابراین، روش های سرولوژی نیز برای تشخیص کاربرد ندارند. در چنین مواردی، روش های مولکولی به عنوان مهم ترین ابزار برای تشخیص خواهند بود (۷).

الف- روش های رایج واکنش زنجیره ای پلیمرراز [Polymerase chain reaction (PCR)]

نمونه های مختلف بالینی مانند بیوپسی پوستی، نمونه حاصل از خراشیدن ضایعات از کف زخم، به علاوه اگزودا و مایع آسپیراسیون ضایعات پوستی برای تشخیص در این روش استفاده می شوند. DNA کیتوپلاست انگل لیشمانیا از دو قسمت حلقه های کوچک و حلقه های بزرگ تشکیل شده است که حلقه های کوچک خود دارای دو بخش ثابت و متغیر هستند. استفاده از DNA کیتوپلاست (KDNA) انگل لیشمانیا برای تشخیص بسیار کاربردی است. از توالی های متغیر موجود در حلقه های کوچک DNA کیتوپلاست برای تشخیص گونه های مختلف لیشمانیا و از توالی های ثابت برای تشخیص

واکنش متقاطع با بیماری شاگاس ندارد، اما با توپرکلوزیس گرانولار و جذام واکنش متقاطع دارد. LST به عنوان یک شاخص برای شیوع لیشمانیوز پوستی، پوستی - مخاطی در انسان و حیوان، و درمان موفق کالاآزار است. اساس این آزمایش که ارزیابی ایمنی سلولی است، بیش تر در مطالعات اپیدمیولوژی و تعیین میزان آندمیسته بیماری استفاده می شود. این روش شامل تزریق داخل جلدی ۰/۱ میلی لیتر آنتی ژن استاندارد (لیشمانیا) در قسمت قدامی ساعد است که بعد از حدود ۴۸ یا ۷۲ ساعت خوانده می شود. برجستگی سفت ایجاد شده، برابر یا بیش تر از ۵ میلی متر، مثبت در نظر گرفته می شود. معمولاً ۳ تا ۴ ماه بعد از بروز ضایعات پوستی آزمایش مثبت می شود. اگرچه این آزمون حساسیت حدود ۹۰ درصد در موارد لیشمانیوز پوستی - مخاطی دارد، ولی در تشخیص لیشمانیوز پوستی دنیای قدیم به جز اشکال لوپوئید زیاد کاربرد ندارد زیرا ممکن است موارد منفی کاذب در لیشمانیوز پوستی آنژیتریک منتشر (DCL) و در موارد لیشمانیوز پوستی کم تر از یک ماه اتفاق بیافتند. معمولاً این آزمون در ۸۰-۹۵ درصد موارد ابتلاء به لیشمانیوز مثبت می شود. علاوه بر این ممکن است نتایج مثبت کاذب در افراد ساکن مناطق اندمیک به خاطر ابتلاء به عفونت های تحت بالینی یا به علت عفونت قبلی ایجاد شود زیرا این آزمون در طول حیات فرد مثبت می ماند. هم چنین این تست می تواند برای تشخیص مسافران مناطق غیر اندمیک مفید باشد (۸). در مطالعه هاشمی و همکاران (۲۰۱۱) دو روش میکروسکوپی و مونته نگر و مقایسه شدند و میزان تطابق (agreement) میان دو روش ۸۷/۹ درصد بود. با توجه به نتایج این مطالعه به نظر می رسد که بتوان LST را به عنوان یک روش تشخیصی مناسب در مواقعی که شک زیادی به لیشمانیوز پوستی وجود دارد اما اسمیر منفی است، معرفی کرد (۳۲). در مجموع، LST در انواع لیشمانیوز پوستی به خصوص اشکال لوپوئید، پوستی - مخاطی، مخاطی و PKDL (متغیر) مثبت و در موارد

جنس لیشمانیا استفاده می شود (۳۸-۳۶). KDNA لیشمانیا را می توان از ادرار بعضی از بیماران دارای لیشمانیوز پوستی، به ویژه در فرم موکوئید، جدا کرد اما حساسیت PCR ادرار برای اهداف تشخیصی در لیشمانیوز پوستی ناکافی است. در مطالعه Veland و همکاران (۲۰۱۴)، حساسیت این روش ۲۰/۹ درصد و ویژگی آن ۱۰۰ درصد گزارش شد (۳۹). اخیراً روش نمونه گیری با استفاده از سوآب پنبه ای برای تشخیص لیشمانیوز پوستی با PCR بیشتر مورد استفاده قرار می گیرد. جمع آوری اگزودا با سوآب، برای بیمار و هم چنین نمونه گیر، آسان، بدون درد و راحت تر است. هم چنین سوآب پنبه ای اثرات مهارکنندگی بر PCR ندارد. اگزودا جمع آوری شده به عنوان یک جایگزین نمونه های بیوپسی، به ویژه در شرایط فیلد، پیشنهاد می شود (۴۰). از کاغذهای واتمن FTA (Flinders Technical Association) نیز برای نمونه گیری مستقیم از ضایعات بیماران در مطالعه اپیدمیولوژیک لیشمانیوز پوستی استفاده می شود. جمع آوری مستقیم نمونه با استفاده از کاغذ FTA امکان آلودگی ایزوله های لیشمانیا در طول پاساژهای کوتاه و بلند مدت کشت در آزمایشگاه و نارضایتی حاصل از گرفتن بیوپسی از بیمار را کاهش می دهد (۴۱). استفاده از FTA برای جمع آوری نمونه حاصل از خراشیدن ضایعات و انجام PCR، به عنوان یک روش راحت و معتبر در تشخیص لیشمانیوز پوستی بکار رفته است (۴۲). از اهداف ژنی و اسید نوکلئیک های مختلف در PCR می توان استفاده کرد. اهداف ژنی مهم شامل 18s-rRNA، زیر واحد کوچک rRNA (SSU rRNA)، توالی ژنی تکرار شونده مانند DNA میکروستلایت ها، نواحی ITS کینتوپلاستی، جایگاه ژنی gp63، ناحیه ژنی β -tubulin و cytochrome b12 (minixon) می باشند (۴۳-۴۷). ویژگی و حساسیت روش PCR در اغلب تحقیقات به ترتیب ۱۰۰ درصد و ۹۸-۹۲ درصد گزارش شده است (۴۸). در مطالعه پورمحمدی و همکاران (۲۰۱۰)، حساسیت سه روش گسترش مستقیم، کشت (در محیط NNN) و

PCR/KDNA در تشخیص لیشمانیوز پوستی مقایسه شد که در نهایت حساسیت PCR، گسترش مستقیم و کشت به ترتیب ۹۳/۶ درصد، ۷۶٫۷ درصد و ۵۰/۹ درصد گزارش شد (۱۵). حساسیت روش PCR با استفاده از DNA کینتوپلاست در اشکال تیپیک لیشمانیوز پوستی ۱۰۰ درصد و در اشکال غیر تیپیک لیشمانیوز پوستی ۹۴ درصد و دارای ویژگی ۱۰۰ درصد است (۵). PCR قادر به تشخیص موارد مثبتی است که با روش های معمولی منفی گزارش شده اند (۴۹). در مقایسه سه روش PCR/KDNA، PCR/7SLRNA و PCR/ITS1 بر روی بیماران مشکوک به لیشمانیوز پوستی، حساس ترین روش PCR/KDNA (۹۱/۸ درصد) بوده است، اما در شناسایی گونه های لیشمانیا ویژگی پایینی دارد. حساسیت PCR/7SLRNA و PCR/ITS1 به ترتیب ۹۰/۵ درصد و ۶۳/۵ درصد و ویژگی هر دو ۱۰۰ درصد گزارش شده است. 7SLRNA محتوای RNA مربوط به کمپلکس نوکلئوپروتئینی (signal recognition particle) می باشد که در شناسایی پروتئین های اختصاصی و ارائه آن ها به شبکه اندوپلاسمی در یوکایوت ها و غشای سلولی در پروکاریوت ها نقش دارد. این کمپلکس به فراوانی و به صورت محافظت شده در سیتوپلاسم وجود دارد. RFLP نیز که بر روی محصول تکثیر PCR/7SLRNA و PCR/ITS1 انجام شد، قادر به تشخیص گونه های لیشمانیا با حساسیت و ویژگی بالا می باشد (۵۰، ۵۱). در مطالعه ای که به وسیله Bouslimi و همکاران (۲۰۱۴) صورت گرفت، PCR-RFLP با تکثیر ناحیه ITS1، DNA ریبوزومی و هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم محدودالانتر HaeIII، با الکتروفورز ایزوآنزیم از نمونه های کشت مثبت در محیط کشت NNN، برای تشخیص گونه های لیشمانیا مقایسه گردید. تکنیک PCR-RFLP به دلیل سادگی، سرعت و توانایی اجرا بر روی نمونه های بالینی در تشخیص گونه های لیشمانیا پیشنهاد شده است (۵۲). تکنیک دیگر PCR-FFL (Fluorescent Fragment Length) می باشد

میکروسکوپی، که روشی زمان بر و نیاز به میکروسکوپیست با تجربه دارد، می‌باشند (۵۵) یک روش RFLP نیز با استفاده از آنزیم محدودالایتر BsuRI بر روی نمونه‌های بیماران در ترکمن صحرا واقع در شمال شرقی ایران به عنوان روش اختصاصی گونه معرفی شد. با این روش برای اولین بار لیشمانیا تورانیکا انگل موش بزرگ صحرائی در انسان گزارش شد (۵۶). تکنیک دیگر Multiplex PCR می‌باشد که از این روش برای تشخیص سریع گونه‌های مختلف لیشمانیا استفاده می‌شود. از این روش برای تشخیص لیشمانیوز پوستی دنیای جدید زیاد استفاده می‌شود (۵۷).

ب- روش‌های نوین

۱- روش Loop-Mediated Isothermal Amplification

(LAMP) یک واکنش ایزوترمال است که فقط در آن از یک آنزیم Bst DNA پلی‌مراز استفاده می‌شود و قادر به تکثیر مقدار زیاد DNA در مدت ۶۰-۳۰ دقیقه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی است (۵۸). محصول تکثیر شده بدون نیاز به الکتروفورز و لامپ UV، با اضافه کردن معرف فلورسانس [Fluorescent detection reagent (FDA)] قبل از تکثیر، قابل مشاهده است. از دیگر مزایای آن عدم نیاز به دستگاه ترموسایکلر می‌باشد (چون واکنش‌ها در دمای ۶۵-۶۰ درجه سانتی‌گراد صورت می‌گیرند) و هم‌چنین ویژگی بالای آن به علت استفاده از ۶ پرایمر (۴ پرایمر اختصاصی گونه و ۲ پرایمر لوپ) است. تکنیک Reverse Transcriptase Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) با هدف ژن 18SrRNA، در تشخیص لیشمانیوز پوستی با استفاده از نمونه‌های بی‌پستی حساسیت ۹۸ درصد را نشان داده است (۵۹).

۲- روش Nucleic acid sequence based assay

(NASBA): این روش با تکثیر RNA در یک واکنش ایزوترمال صورت می‌گیرد. کاربرد وسیع این ابزارهای نوین در تشخیص و کنترل لیشمانیوز به دلیل پیچیدگی و عدم فرمت استاندارد روند کندی دارد (۶۰، ۶۱).

که در این روش از پرایمرهای متصل به رنگ فلورسانس که برای مناطق 7SL و ITS-1 rRNA طراحی شده، استفاده می‌گردد. مقایسه این روش با PCR-RFLP نشان داد که PCR-FFL (دارای حساسیت ۸۳/۳ درصد در ITS-1 و حساسیت ۹۴/۴ درصد در 7SL) روشی دقیق، سریع و حساس‌تر از PCR-RFLP (به ترتیب حساسیت ۷۵ درصد و ۸۰/۶ درصد) می‌باشد (۵۳). در میان روش‌های تایپینگ انگل لیشمانیا، روش میکروستلایت (MLMT: Multilocus Microsatellite Typing) ابزار دقیق، سریع و قابل اعتماد برای مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی و ژنتیک جمعیت گونه‌های مختلف لیشمانیا بوده و جایگزین بسیار مناسبی برای روش ایزوآنزیم در طبقه‌بندی و تعیین سوش این انگل‌ها می‌باشد. در این روش میزان هتروژنیسیته و تنوع آلی در لوکوس‌های پلی‌مورفیک را می‌توان شناسایی نمود. از ویژگی‌هایی این روش می‌توان به عدم نیاز به کشت انبوه، ساده، ارزان و قابل انجام بودن بر روی نمونه‌های کلینیکی اشاره نمود (۳). در میان روش‌های مختلف، روش Real-time PCR، با هدف minicircles kDNA، برای شناسایی گونه‌ها دارای حساسیت بالایی است. علاوه بر این، PCR/ITS-1، هضم آنزیمی با HaeIII و یک الگوریتم ترکیبی شامل PCR/hsp70 و RFLP نیز از مناسب‌ترین روش‌ها برای شناسایی گونه‌ها می‌باشند (۵۴). تکنیک‌های Nested-PCR و ایمونوهیستوشیمی تست‌های حساس برای تشخیص اشکال تیپیک و غیر تیپیک لیشمانیوز پوستی هستند و به عنوان روش‌های تکمیلی در موارد مشکوک دارای نتایج میکروسکوپی منفی می‌باشند. در مطالعه شیریان (۲۰۱۴) روش Nested-PCR با هدف تکثیر قطعه متغیر در minicircles از DNA کینتوپلاست، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی گونه LIN R4-LIN17-LIN19، برای تشخیص گونه‌های لیشمانیا استفاده شد (۵).

روش‌های مولکولی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، دقیق‌تر، حساس‌تر و اختصاصی‌تر از روش

۴- HRM (High Resolution Melt): HRM یک روش Real time است که اساس آن در حقیقت تمایز رشته DNA بر مبنای نقطه ذوب، میزان محتویات GC، طول قطعه و هتروزیگوسیتی است که سبب اختلاف در منحنی ذوب می گردد که نتایج این داده ها را می توان برای غربالگری جهش، متیلاسیون و دیگر تحقیقات کاربردی استفاده کرد (۶۷-۶۵). در این روش از رنگ های فلورسنت (مانند ResoLight, EvaGreen, LC Green) استفاده می گردد که این رنگ ها توانایی اتصال به DNA دو رشته ای را دارند و به عنوان رنگ های بین لایه ای یا intercalating dye شناخته می شوند و در غلظت های بالا سبب مهار RCP نمی شوند. حساسیت این روش به اندازه ای است که می تواند جهش های ایجاد شده در حد چند باز را نیز شناسایی کند و بیشترین کاربرد آن برای تعیین موتاسیون های نقطه ای و پلی مورفیسم تک نوکلوتیدی (SNP) می باشد. از مزایای روش HRM برای تشخیص بیماری لیشمانیوز می توان به مواردی همچون تشخیص اولیه بیماری در نمونه های بالینی مختلف، تشخیص گونه انگل به طور همزمان و برآورد میزان بار انگلی در نمونه های کلینیکی اخذ شده اشاره کرد. بنابر این، با انجام یک تست می توان به چندین هدف دست یافت. حساسیت این روش در مطالعات اخیر انجام شده توسط محققین برابر با ۱ انگل در هر واکنش و ویژگی آن ۱۰۰ درصد می باشد. علاوه بر بیماران مبتلا به لیشمانیوز پوستی می توان از این روش برای شناسایی انگل در ناقلین و مخازن نیز استفاده نمود (۶۸، ۶۹).

۲-۲ روش های بیوشیمیایی

استفاده از الکتروفورز ایزوآنزیم ها در سال ۱۹۷۰ میلادی معرفی و به عنوان روش انتخابی جهت تعیین هویت گونه های لیشمانیا مطرح شد. بر خلاف استفاده از چگالی شناوری DNA، آنالیز زایمومی یا همان روش الکتروفورز ایزوآنزیم چندین لوکوس

اخیراً OligoC-Test و NASBA-Oligochromatography (OC) به عنوان فرمت هایی مفید برای تشخیص مولکولی ساده در آینده، متناسب با استانداردها، برای انگل لیشمانیا معرفی شده اند (۶۲-۶۰). اساس این روش تکثیر قطعه کوتاه در SrDNA (PCR) ۱۸ و RNA (NASBA) است که در نهایت جداسازی سریع و ساده محصولات تکثیر شده را به صورت یک نوار (dipstick) فراهم می کند (۶۱). تکنیک دیگر Quantitative nucleic acid sequence-based amplification (QT-NASBA) می باشد که در مطالعه Vander Meide و همکاران (۲۰۰۵) از این روش برای جداسازی انگل های لیشمانیا و هم چنین برای تعیین میزان تراکم (تعداد) انگل در نمونه های بیوپسی پوست بیماران استفاده شد. نتایج نشان داد که این روش یک روش معتبر، حساس و اختصاصی برای جداسازی انگل های لیشمانیا از نمونه های بیوپسی پوست است که از ویژگی و حساسیت زیادی برخوردار می باشد. هم چنین این روش توانایی تعیین مقدار کمی گونه های لیشمانیا دنیای جدید و قدیم در نمونه های بیوپسی پوست را دارا می باشد و می تواند به عنوان یک ابزار تشخیصی مهم برای پیگیری درمان بیماران مورد استفاده قرار گیرد (۶۳).

۳-آپتامر: لغت آپتامر از کلمه لاتین آپتوس به معنی مناسب گرفته شده است که رفتار قفل و کلید را با مولکول هدف خود دارد که از این جهت دارای شباهت زیادی به آنتی بادی ها می باشد (۳۱). اخیراً محققین از آپتامر به عنوان ابزاری قدرتمند برای شناسایی آنتی ژن اختصاصی لیشمانیا (H2A) و طراحی کیت های تشخیصی و یا روش های تشخیصی نوین و همچنین اهداف دارویی در بیماری لیشمانیوز استفاده می کنند. آپتامرها (Aptamer) اولیگونوکلئوتیدهایی تک زنجیره ای کوتاه با تمایل بسیار بالا برای اتصال به RNA یا DNA مولکول هدف خود می باشند. آن ها با اختصاصیت و تمایل بسیار بالا به واسطه ویژگی شکل ساختمان سوم خود به مولکول هدف متصل می شوند (۶۴).

(Multi locus enzyme electrophoresis) دارای قدرت تفکیک بالایی بوده و قادر است تنوع فراوان موجود در گونه‌های لیثمانیا را مشخص نماید. این روش بر اساس الکتروفورز ایزوآنزیم‌های لیثمانیا بر روی ژل‌های استات سلولز و پلی‌کریل آمید و تعیین زایموم‌های انگل می‌باشد. در این روش ابتدا انگل را در محیط‌های کشت به تولید انبوه رسانده و سپس با جمع‌آوری انگل و تهیه عصاره آن الکتروفورز انجام می‌شود. در حال حاضر با تمام پیشرفت‌های گسترده در خصوص روش‌های تایپینگ انگل‌های لیثمانیا، هنوز آنالیز زایمومی به عنوان روش استاندارد طلایی برای تعیین هویت انگل و تایپینگ لیثمانیا مطرح است (۷۰، ۶۵). در سال ۱۹۸۷ میلادی Awadalla و همکارانش (۱۹۸۷) در مصر توانستند چهار آنزیم MDH, MPI, GPI و NH را به عنوان آنزیم‌های مناسب برای تمایز نمونه‌های پوستی و احشایی معرفی کنند (۷۱). هم‌چنین طی مطالعاتی که Okot و همکارانش (۱۹۸۹) در کنیا انجام دادند کارایی فوق‌العاده چهار آنزیم ME, MDH, MPI و PGM را در ایجاد تمایز بین سوش‌های ایجادکننده لیثمانیوز پوستی و احشایی معرفی نموده و قدرت آنزیم PGD را در تفکیک سویه‌های مزبور رد کردند (۷۲).

در مطالعه فخار و همکاران (۲۰۰۹) پنج سیستم آنزیمی شامل MDH, NH₂, G6PD, GPI و PGM برتر برای تفکیک گونه‌های انگل لیثمانیا معرفی شدند. در مطالعه حاضر، آنزیم‌های GPI و G6PD بیش‌ترین هتروژنتی و آنزیم NH₂ بیش‌ترین هموزیگوتی را در بین ایزوله‌های مختلف داشتند (۶۵). با توجه به مطالعاتی که توسط حاتم و سایر محققین نیز بر روی سیستم‌های آنزیمی مختلف انجام شده است، آنزیم‌های MDH, GPI, PGM, NH₁ و NH₂ برای مطالعه روی نمونه‌های پوستی مناسب‌تر می‌باشند (۷۰، ۷۴-۷۲). هم‌چنین اختلافاتی که در کاربرد آنزیم‌های مختلف مشاهده می‌شود، می‌تواند ناشی از نوع سیستم به کار رفته (پیوسته یا غیر پیوسته) و یا نوع ژل (ژل استات

سلولز و یا ژل پلی‌آکریلامید) باشد که در اغلب مطالعات محققین از ژل استات سلولز به علت ارزان‌تر و آسان‌تر بودن آن استفاده می‌کنند، اما ژل پلی‌آکریلامید هرچند گران‌تر بوده ولی از قدرت تفکیک بیشتری برخوردار است. مهاجری و همکاران نیز در سال ۲۰۰۵ در شهر مشهد شش سیستم آنزیمی MDH, PGM, GPI, G6PD, NH₁, NH₂ را برای تفکیک گونه‌های عامل لیثمانیوز پوستی معرفی کردند (۷۴). این روش امروزه به عنوان روشی دقیق مطرح می‌باشد چرا که در آن امکان بررسی و مقایسه تا بیش از ۲۰ سیستم آنزیمی وجود دارد. هرچند که این روش طولانی است ولی برای بررسی سیستم آنزیمی هر سویه حداقل به تعداد ۱۰^{۱۰} انگل در میلی‌لیتر محیط کشت احتیاج است و این امر برای تشخیص بعضی سویه‌های کند رشد و تا حدی کم رشد مشکل‌ساز می‌باشد (۷۵).

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که به طور کلی می‌توان گفت که هنوز روش استاندارد طلایی برای تشخیص لیثمانیوز پوستی روش‌های پارازیتولوژی شامل روش‌های میکروسکوپی و کشت (به ویژه میکروکالچر) می‌باشند که از بین این دو روش میکروکالچر حساسیت بالاتری دارد. در حال حاضر روش معمول میکروسکوپی به‌عنوان معتبرترین و در دسترس‌ترین روش برای تشخیص لیثمانیوز پوستی در نظر گرفته می‌شود. در صورت منفی شدن آن، روش جایگزین میکروکالچر به عنوان یک روش معتبر، ساده و ارزان کاربرد دارد. البته در صورت امکان از روش PCR نیز می‌توان استفاده نمود که دارای حساسیت بالاتری می‌باشد. با توجه به پیشرفت‌های اخیر در حوزه بیولوژی مولکولی و بیوتکنولوژی روش‌های مختلفی برای شناسایی و تعیین هویت (تایپینگ) انگل لیثمانیا طراحی و پیشنهاد شده‌اند که در حال حاضر روش بررسی الگوهای ایزوآنزیمی به عنوان استاندارد طلایی تایپینگ و روش جایگزین آن روش میکروستلایت

یکی از روش های فوق یا تلفیقی از آن ها را استفاده نمایند.

(بدون نیاز به کشت انبوه، ساده و ارزان) مطرح شده است. لذا محققین بایستی باتوجه به اهداف مطالعه خود

References

- Galluzzo C, Eperon G, Mauris A, Chappuis F. Old World cutaneous leishmaniasis. *Rev Med Suisse* 2013; 9(385): 990-995.
- Blonski KM, Blödorn-Schlicht N, Falk TM, Faye RS, Clausen OP. Increased detection of cutaneous leishmaniasis in Norway by use of polymerase chain reaction. *Apmis* 2012; 120(7): 591-596.
- Fakhar M, Motazedian M, Daly D, Lowe C, Kemp S, Noyes H. An integrated pipeline for the development of novel panels of mapped microsatellite markers for *Leishmania donovani* complex, *Leishmania braziliensis* and *Leishmania major*. *Parasitology* 2008; 135(05): 567-574.
- Yaghoahi-Ershadi M. Rodent control operations against zoonotic cutaneous leishmaniasis in rural Iran. *Ann Saudi Med* 2005; 25(4): 309-312.
- Shirian S, Oryan A, Hatam G-R, Panahi S, Daneshbod Y. Comparison of Conventional, Molecular, and Immunohistochemical Methods in Diagnosis of Typical and Atypical Cutaneous Leishmaniasis. *Arch Pathol Lab Med* 2014; 138(2): 235-240.
- 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): 46-52.
- Singh S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian J Med Res* 2006; 123(3): 311-330.
- Masmoudi A, Hariz W, Marrekchi S, Amouri M, Turki H. Old World cutaneous leishmaniasis: diagnosis and treatment. *J Dermatol Case Rep* 2013; 7(2): 31-41.
- Yücel A, Günüşti S, Denli Y, Uzun S. Cutaneous leishmaniasis: new dermoscopic findings. *Int J Dermatol* 2013; 52(7): 831-837.
- Swick B L. Polymerase chain reaction-based molecular diagnosis of cutaneous infections in dermatopathology. *Semin Cutan Med Surg* 2012; 31(4): 241-246.
- Navin TR, Arana FE, de Mérida AM, Arana BA, Castillo AL, Silvers DN. Cutaneous leishmaniasis in Guatemala: comparison of diagnostic methods. *Am J Trop Med Hyg* 1990; 42(1): 36-42.
- Pagheh A, Fakhar M, Mesgarian F, Gholami S, Ahmadpour E. An improved microculture method for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *J Parasit Dis* 2014; 38(4): 347-351.
- Ranawaka R, Abeygunasekara P, Weerakoon H. Correlation of clinical, parasitological and histopathological diagnosis of cutaneous leishmaniasis in an endemic region in Sri Lanka. *Ceylon Med J* 2013; 57(4): 149-152.
- Alarcon I, Carrera C, Puig S, Malvehy J. In vivo Confocal Microscopy Features of Cutaneous Leishmaniasis. *Dermatology* 2014; 228(2): 121-124.
- Pourmohammadi B, Motazedian M, Hatam G, Kalantari M, Habibi P, Sarkari B. Comparison of three methods for diagnosis

- of cutaneous leishmaniasis. *Iran J Parasitol* 2010; 5(4): 1-8.
16. Kheirandish F, Sharafi AC, Kazemi B, Bandehpour M, Khamesipour A. First molecular identification of *Leishmania* species in a new endemic area of cutaneous leishmaniasis in Lorestan, Iran. *Asian Pac J Trop Med* 2013; 6(9): 713-717.
 17. Leishmaniasis (Cutaneous and Visceral). Available from: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/leishmaniasis.pdf>. Accessed October, 2009.
 18. Habibi P, Motazdian MH, Esfandiari F, Fakhar M. Introduction a simple and rapid modified blood agar media for mass cultivation of *Leishmania* Spp. *Armaghane-Danesh* 2006; 10(4): 47-54.
 19. Sharquie KE, Hassen AS, Hassan SA, Al-Hamami IA. Evaluation of diagnosis of cutaneous leishmaniasis by direct smear, culture and histopathology. *Saudi Med J* 2002; 23(8): 925-928.
 20. Allahverdiyev AM, Uzun S, Bagirova M, Durdu M, Memisoglu HR. A sensitive new microculture method for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 70(3): 294-297.
 21. Nadim A, Mohebbali M, Javadian I. *Leishmania* and leishmaniasis. First ed, Tehran, Iran, Center for Academic Publication, 2009.
 22. Uthman MA, Satir AA, Tabbara KS. Clinical and histopathological features of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Saudi Arabia. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2005; 19(4): 431-436.
 23. Hosseinzadeh M, Omidifar N, Lohrasb MH. Use of fine needle aspiration cytology in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis: a comparison with the conventional scraping method. *Trop Doct* 2012; 42(2): 112-113.
 24. Reis Lde C, Brito ME, Almeida EL, Félix SM, Medeiros AC, Silva CJ, et al. Clinical, epidemiological and laboratory aspects of patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008; 41(5): 439-443.
 25. Vidigal Cde P, Marcussi VM, Marcussi LM, Mikcha JM, Arraes SM, Lonardon MV, et al. Enzyme immunoassay using *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* antigens for laboratorial diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop* 2008; 107(2): 208-212.
 26. Skraba CM, Pedroso RB, Fiorini A, Rosado FR, Aristides SMA, Lonardon MVC, et al. Diagnosis of American cutaneous leishmaniasis by enzyme immunoassay using membrane antigens of *Leishmania Viannia braziliensis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014; 78(4): 411-417.
 27. Celeste BJ, Sanchez MC, Ramos-Sanchez EM, Castro LGM, Costa FAL, Goto H. Recombinant *Leishmania infantum* Heat Shock Protein 83 for the Serodiagnosis of Cutaneous, Mucosal, and Visceral Leishmaniases. *Am J Trop Med Hyg* 2014; 90(5): 860-865.
 28. Pereira VR, Reis Lde C, Souza Mde A, de Oliveira AP, de Brito ME, Lage PS, et al. Evaluation of anti-lived and anti-fixed *Leishmania Viannia braziliensis* promastigote IgG antibodies detected by flow cytometry for diagnosis and post-therapeutic cure assessment in localized cutaneous leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 74(3): 292-298.

29. Pomares C, Despierres L, del Giudice P, Delaunay P, Michel G, Ferrua B, et al. Western blot analysis as an aid for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2012; 106(7): 452-454.
30. Longoni SS, Marín C, Sánchez-Moreno M. Excreted *Leishmania peruviana* and *Leishmania amazonensis* iron-superoxide dismutase purification: Specific antibody detection in Colombian patients with cutaneous leishmaniasis. *Free Radic Biol Med* 2014; 69: 26-34.
31. Fakhar M, Mohebbali M, Ahmadpoor E. *Visceral Leishmaniasis (kala-azar)*. First ed Gorgan, Iran, Nouroozi Publisher, 2014.
32. Hashemi SN, Mohebbali M, Mansouri P, Bairami A, Hajjarian H, Akhoundi B, et al. Comparison of leishmanin skin test and direct smear for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Acta Med Iran* 2011; 49(3): 136-141.
33. Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 2006; 44(4): 1435-1439.
34. Motazedian M, Fakhar M, Motazedian MH, Hatam G, Mikaeili F. A urine-based polymerase chain reaction method for the diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompetent patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 60(2): 151-154.
35. Shahbazi F, Shahabi S, Kazemi B, Mohebbali M, Abadi AR, Zare Z. Evaluation of PCR assay in diagnosis and identification of cutaneous leishmaniasis: a comparison with the parasitological methods. *Parasitol Res* 2008; 103(5): 1159-1162.
36. Karamian M, Motazedian MH, Fakhar M, Pakshir K, Jowkar F, Rezanezhad H. Atypical presentation of Old-World cutaneous leishmaniasis, diagnosis and species identification by PCR. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2008; 22(8): 958-962.
37. Pagheh AS, Fakhar M, Mesgarian F, Gholami Sh, Badiee F. Detection and identification of causative agent of cutaneous leishmaniasis in referred patients to the Health center of Gonbade-Qabus from Golestan Province using specific PCR. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2012; 21(86): 84-92.
38. Fakhar M, Mikaeili F, Hatam GR, Habibi P, Karamian M, Motazedian MH, et al. Molecular epidemiology survey of cutaneous leishmaniasis in referral patients to Parasitology lab at Shiraz's School of Medicine and importance application of PCR for diagnosis of disease. *J Jahrom Univ Med Sci* 2010; 8(10): 1-6.
39. Veland N, Espinosa D, Valencia BM, Ramos AP, Calderon F, Arevalo J, et al. Polymerase chain reaction detection of *Leishmania* kDNA from the urine of Peruvian patients with cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2011; 84(4): 556-561.
40. Mimori T, Matsumoto T, Calvopina M, Gomez E, Saya H, Katakura K, et al. Usefulness of sampling with cotton swab for PCR-diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the New World. *Acta trop* 2002; 81(3): 197-202.
41. Kato H, Cáceres AG, Mimori T, Ishimaru Y, Sayed AS, Fujita M, et al. Use of FTA cards for direct sampling of patients' lesions in the ecological study of cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 2010; 48(10): 3661-3665.

42. Miranda A, Saldaña A, González K, Paz H, Santamaría G, Samudio F, et al. Evaluation of PCR for cutaneous leishmaniasis diagnosis and species identification using filter paper samples in Panama, Central America. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2012; 106(9): 544-548.
43. da Silva ES, Gontijo CM, Pacheco Rda S, Brazil RP. Diagnosis of human visceral leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. *Genet Mol Res* 2004; 30(2): 251-257.
44. Foulet F, Botterel F, Buffet P, Morizot G, Rivollet D, Deniau M, et al. Detection and identification of *Leishmania* species from clinical specimens by using a real-time PCR assay and sequencing of the cytochrome B gene. *J Clin Microbiol* 2007; 45(7): 2110-2115.
45. Gangneux J-P, Menotti J, Lorenzo F, Sarfati C, Blanche H, Bui H, et al. Prospective value of PCR amplification and sequencing for diagnosis and typing of old world *Leishmania* infections in an area of nonendemicity. *J Clin Microbiol* 2003; 41(4): 1419-1422.
46. Pizzuto M, Piazza M, Senese D, Scalamogna C, Calattini S, Corsico L, et al. Role of PCR in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis in patients coinfecting with human immunodeficiency virus type 1. *J Clin Microbiol* 2001; 39(1): 357-361.
47. Wortmann G, Sweeney C, Houg H-S, Aronson N, Stiteler J, Jackson J, et al. Rapid diagnosis of leishmaniasis by fluorogenic polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65(5): 583-587.
48. Vega-López F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16(2): 97-101.
49. Lavergne R, Iriart X, Martin-Blondel G, Chauvin P, Menard S, Fillaux J, et al. Contribution of molecular diagnosis to the management of cutaneous leishmaniasis in travellers. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20(8): O528-O530.
50. Azmi K, Nasereddin A, Ereqat S, Schnur L, Schonian G, Abdeen Z. Methods incorporating a polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism and their use as a 'gold standard' in diagnosing Old World cutaneous leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 71(2): 151-155.
51. Hajjaran H, Vasigheh F, Mohebbali M, Rezaei S, Mamishi S, Charedar S. Direct diagnosis of *Leishmania* species on serosity materials punctured from cutaneous leishmaniasis patients using PCR-RFLP. *J Clin Lab Anal* 2011; 25(1): 20-24.
52. Bousslimi N, Ben Abdal, Ben Mously R, Siala E, Harrat Z, Zallagua N, et al. Contribution of leishmania identification using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymerase for epidemiological studies of cutaneous leishmaniasis in Tunisia. *Pathol Biol (Paris)* 2014; 62(1): 30-33.
53. Tomás-Pérez M, Fisa R, Riera C. The Use of Fluorescent Fragment Length Analysis (PCR-FFL) in the Direct Diagnosis and Identification of Cutaneous *Leishmania* Species. *The Am J Trop Med Hyg* 2013; 88(3): 586-591.
54. Cruz I, Millet A, Carrillo E, Chenik M, Salotra P, Verma S, et al. An approach for interlaboratory comparison of conventional and real-time PCR assays for diagnosis of human leishmaniasis. *Exp Parasitol* 2013; 134(3): 281-289.

55. Azizi Koroush, Soltani Aboozar, Alipour Hamzeh. Molecular detection of *Leishmania* isolated from Cutaneous leishmaniasis patients in Jask County, Hormozgan Province, Southern Iran, 2008. *Asian Pac J Trop Med* 2012; 5(7): 514-517.
56. Bordbar A, Parvizi P. High infection frequency, low diversity of *Leishmania major* and first detection of *Leishmania turanica* in human in northern Iran. *Acta Trop* 2014; 133: 69-72.
57. World Health Organization (WHO). Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010.
58. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 2000; 15.28(12): E63.
59. Adams ER, Schoone GJ, Ageed AF, Safi SE, Schallig HD. Development of a reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the sensitive detection of *Leishmania* parasites in clinical samples. *Am J Trop Med Hyg* 2010; 82(4): 591-596.
60. Mugasa CM, Laurent T, Schoone GJ, Basiye FL, Saad AA, El Safi S, et al. Simplified molecular detection of *Leishmania* parasites in various clinical samples from patients with leishmaniasis. *Parasit Vectors* 2010; 3(1): 13.
61. Saad AA, Ahmed NG, Osman OS, Al-Basheer AA, Hamad A, Deborggraeve S, et al. Diagnostic accuracy of the *Leishmania* OligoC-TesT and NASBA-Oligochromatography for diagnosis of leishmaniasis in Sudan. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4(8): e776.
62. Deborggraeve S, Laurent T, Espinosa D, Van der Auwera G, Mbuchi M, Wasunna M, et al. A simplified and standardized polymerase chain reaction format for the diagnosis of leishmaniasis. *J Infect Dis* 2008; 198(10): 1565-1572.
63. Van der Meide WF, Schoone GJ, Faber WR, Zeegelaar JE, de Vries HJ, Özbel Y, et al. Quantitative nucleic acid sequence-based assay as a new molecular tool for detection and quantification of *Leishmania* parasites in skin biopsy samples. *J Clin Microbiol* 2005; 43(11): 5560-5566.
64. Martín ME, García-Hernández M, García-Recio EM, Gómez-Chacón GF, Sánchez-López M, González VM. DNA Aptamers Selectively Target *Leishmania infantum* H2A Protein. *PloS One* 2013; 8(10): e78886.
65. Fakhar M, Mikaeili F, Hatam GHR, Motazedian MH, Habibi P, Fallah E. Application of superior enzymatic systems for characterization of causative agents of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Iran using isoenzyme electrophoresis. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2009; 19(70): 41-48.
66. Ceccarelli M, Galluzzi L, Migliazzo A, Magnani M. Detection and Characterization of *Leishmania* (*Leishmania*) and *Leishmania* (*Viannia*) by SYBR Green-Based Real-Time PCR and High Resolution Melt Analysis Targeting Kinetoplast Minicircle DNA. *PloS One* 2014; 9(2): e88845.
67. Nasereddin A, Jaffe CL. Rapid diagnosis of Old World Leishmaniasis by high-resolution melting analysis of the 7SL RNA gene. *J Clin Microbiol* 2010; 48(6): 2240-2242.
68. Talmi-Frank D, Nasereddin A, Schnur LF, Schönian G, Töz SÖ, Jaffe CL, et al. Detection and identification of old world *Leishmania* by high resolution melt analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4(1): e581.

69. Hernández C, Alvarez C, González C, Ayala MS, León CM, Ramírez JD. Identification of Six New World Leishmania species through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. *Parasit Vectors* 2014; 7(1): 501.
70. Hatam G, Riyad M, Bichichi M, Hejazi S, Guessous-Idrissi N, Ardehali S. Isoenzyme characterization of Iranian Leishmania isolates from cutaneous leishmaniasis. *Iran J Sci Technol* 2005; 29(1): 65-70.
71. Awadalla H, Mansour N, Mohareb E. Further characterization of Leishmania isolates from children with visceral infection in Alexandria area, Egypt. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987; 81(6): 915-917.
72. Okot-Kotber BM, Mutinga MJ, Kaddu JB. Biochemical characterization of Leishmania spp. isolated from man and wild animals in Kenya. *Int J Parasitol* 1989; 19(6): 657-663.
73. Hatam GR, Rezanezhad H, Motazedian MH, Sarkari B. In Vitro Infectivity of Leishmania major Isolated from Patients with Different Clinical Forms of Cutaneous Leishmaniasis and Its Association with Parasite Zymodemes. *Iran J Parasitol* 2009; 4(3): 52-60.
74. Mohajeri M, Hatam GR, Shamsin A, Javaheri A. Isolation and characterization of *L. major* in Mashhad, *J Mashhad Univ Med Sci* 2005; 88(2): 177-184.
75. Mikhail E, Mansour N, Mohareb E, Francies W. Identification of a misleading trypanosomatid parasite from Gerbillus pyramidum and G. andersoni in a Leishmania major endemic area in north Sinai. *J Parasitol* 1996; 82(3): 400-404.