BRIEF REPORT

Molecular Detection of Leishmania spp. in Negative Smears of Patients with Cutaneous Leishmaniasis in Bam, Southeast Iran

Hajar Ziaei Hezarjaribi[1],
Naser Emadi[2],
Shabnam Asfaram[3],
Tahmineh Geran Orimi[4],
Majid Derakhshani-niya[4],
Mahdi Fakhar[5]

[1]Associate Professor, Molecular and Cell Biology Research Center, Department of Parasitology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2]Assistant Professor, Department of Dermatology, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3] PhD Student in Parasitology, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] MSc in Parasitology, Leishmaniasis Research Center, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran
[5]Associate Professor, Toxoplasmosis Research Center, Department of Parasitology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received November 4, 2018 ; Accepted May 7, 2019)

Abstract

Background and purpose: There are various clinical forms of cutaneous leishmaniasis (CL) and there is lack of access to diagnostic local laboratories especially in endemic regions. The present study aimed to conduct molecular examination of the typical and atypical clinical forms of CL in endemic area of Bam, Iran.

Materials and methods: This cross-sectional study was carried out between 2013 and 2014. The diagnosis was performed by direct smears from skin lesions, Giemsa staining, and microscopic examination. Total DNA was extracted from positive and negative direct smears. PCR method was used to determine the genus and species of *Leishmania*.

Results: In this study, 353 suspected cases of CL in Bam Health Center were investigated of whom 278 (78.7%) were positive by microscopic examination. Forty skin smears from typical lesions were positive by both PCR and microscopic examinations, but out of 40 skin smears from atypical lesions which were negative by microscopic observation, *Leishmania* DNA was detected in 6 (15%) samples. *Leishmania tropica* was identified in all positive samples.

Conclusion: In current study, microscopy method was not found reliable enough for diagnosis of CL. Therefore, for early diagnosis of the disease PCR is recommended in negative smears of patients suspected of CL.

Keywords: cutaneous leishmaniasis, negative smear, microscopy method, PCR

J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 29 (173): 123-127 (Persian).

* **Corresponding Author: Mahdi Fakhar -** Toxoplasmosis Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: mahdi53@yahoo.com)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]

گزارش کوتاه

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و نهم شماره 173 خرداد سال 1398 (127-123)

شناسایی مولکولی انگل لیشمانیا در اسمیرهای منفی بیماران مبتلا به لیشمانیوز پوستی در شهرستان بم، جنوب شرق ایران

هاجر ضیایی هزار جریبی[1]
ناصر عمادی[2]
شبنم اسفرم[3]
تهمینه گران اوریمی[4]
مجید درخشانی نیا[4]
مهدی فخار[5]

چکیده

سابقه و هدف: با توجه به وجود اشکال بالینی مختلف لیشمانیوز پوستی و عدم دسترسی به روش‌های تشخیصی مولکولی به ویژه در آزمایشگاه‌های تشخیصی مناطق آندمیک، مطالعه حاضر با هدف شناسایی مولکولی انگل لیشمانیا در اشکال معمول و غیر معمول بالینی لیشمانیوز پوستی در منطقه اندمیک بم انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه مقطعی طی سال های 1393-1392 انجام شد. تشخیص بیماری با تهیه اسمیر از زخم‌های پوستی، رنگ آمیزی گیمسا و بررسی میکروسکوپی صورت گرفت. از اسمیرهای مثبت و منفی بیماران DNA استخراج و سپس جهت تعیین جنس و گونه انگل لیشمانیا آزمایش PCR انجام شد.

یافته‌ها: در این مطالعه 353 بیمار مشکوک به لیشمانیوز پوستی مراجعه کننده به مرکز بهداشت شهرستان بم مورد بررسی قرار گرفتند که 278 نفر(78/7 درصد) در بررسی میکروسکوپی مثبت بودند. در بررسی مولکولی، 40 اسمیر تهیه شده از زخم‌های معمول بیماران با هر دو روش میکروسکوپی و PCR مثبت شدند اما از 40 نمونه تهیه شده از زخم‌های غیر معمول که در بررسی میکروسکوپی منفی بودند، در 6 مورد (15 درصد) DNA انگل لیشمانیا شناسایی شد. گونه شناسایی شده در تمامی نمونه های مثبت، *لیشمانیا تروپیکا* بود.

استنتاج: نتایج این مطالعه نشان داد که انجام آزمایش مستقیم میکروسکوپی برای تشخیص سالک در مناطق آندمیک به اندازه کافی قابل اعتماد نیست. علاوه بر این، انجام PCR بر روی اسمیر منفی افراد مشکوک به منظور درمان به موقع توصیه می شود.

واژه های کلیدی: لیشمانیوز پوستی، اسمیر منفی، روش میکروسکوپی، PCR

مقدمه

بیماری لیشمانیوز پوستی (سالک) در مناطق آندمیک، سالانه عوارض فردی، اجتماعی و حتی بار اقتصادی فراوانی بر جامعه تحمیل می کند، لذا اقدامات تشخیصی - درمانی به موقع و اجرای برنامه‌های کارآمد جهت

مولف مسئول: مهدی فخار- ساری: کیلومتر 17 جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبراعظم، دانشکده پزشکی E-mail:mahdi53@yahoo.com
1. دانشیار، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، گروه انگل شناسی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
2. استادیار، گروه پوست، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
3. دانشجوی دکتری انگل شناسی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
4. کارشناس ارشد انگل شناسی پزشکی ، مرکز تحقیقات لیشمانیوز، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار ، ایران
5. دانشیار، مرکز تحقیقات توکسوپلاسموز، گروه انگل شناسی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : 1397/8/13 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :1397/8/29 تاریخ تصویب : 1398/2/22

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]

پیشگیری از این بیماری ضروری است(1). سالیانه حدود 20 هزار مورد ابتلا به سالک از ایران گزارش می‌شود(2). تشخیص این بیماری، بر اساس نشانه‌های بالینی مشکل بوده و به دلیل داشتن اشکال مختلف بالینی، تشخیص افتراقی آن از سایر بیماری‌های پوستی مانند سل پوستی و عفونت‌های قارچی از اهمیت خاصی برخوردار است. امروزه جهت تشخیص و شناسایی گونه‌های انگل *لیشمانیا* از روش‌های مولکولی مانند انواع PCR (واکنش زنجیره‌ای پلیمراز) استفاده می‌شود(4،3). وجود اشکال غیر معمول بالینی (آتیپیک) و عدم وجود آزمایشگاه‌های تشخیص طبی معتبر در مناطق آندمیک، یکی از چالش‌های موجود است. لذا هدف از این مطالعه شناسایی مولکولی انگل لیشمانیا در اشکال معمول و غیرمعمول بالینی لیشمانیوز پوستی در منطقه اندمیک بم(2) با تاکید بر مواردی که در روش میکروسکوپی منفی شده اند، انجام شد.

مواد و روش ها

این مطالعه توصیفی- مقطعی در طی سال های 1393- 1392 بر روی بیماران مشکوک به سالک مراجعه کننده به مرکز بهداشت شهرستان بم (به عنوان یک کانون آندمیک لیشمانیوز پوستی نوع شهری) صورت گرفته است. تشخیص بیماری با تهیه اسمیر مستقیم از زخم‌های پوستی و رنگ‌آمیزی به روش گیمسا صورت گرفت. در مجموع، 353 اسمیر تهیه شده از بیماران، مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفت. در مجموع، تعداد 40 اسمیر تهیه شده از زخم های معمول و 40 اسمیر از زخم های غیرمعمول برای انجام PCR انتخاب شدند. استخراج DNA از اسلایدهای رنگ آمیزی شده بیماران با روش فنل –کلروفرم- ایزوآمیل الکل انجام شد(5). در این مطالعه،PCR اختصاصی جنس(6) و گونه لیشمانیا(7) با استفاده از پرایمرهای ناحیه مینی سیرکل ژن kDNA بر روی80 نمونه انجام شد.

یافته ها و بحث

بررسی اسمیرهای تهیه شده از بیماران نشان داد که از تعداد 353 مورد، 278 نفر (78/7 درصد) دارای اسمیر مثبت بودند. در مطالعه حاضر، تمام زخم‌های معمول هم در بررسی میکروسکوپی و هم مولکولی PCR مثبت بودند. اما دربررسی میکروسکوپی در 40 بیمار با زخم‌های غیر معمول که نتایج روش میکروسکوپی آن‌ها منفی بود، آزمایش PCR اختصاصی برای شناسایی جنس و گونه صورت گرفت که در 6 مورد (15 درصد) از آن‌ها DNA کینتوپلاستی انگل *لیشمانیا* شناسایی شد. هم‌چنین گونه انگل در مقایسه با گونه‌های مرجع در تمام نمونه‌های مورد بررسی *لیشمانیا تروپیکا* بود. متداول‌ترین روش برای تشخیص آزمایشگاهی لیشمانیوز پوستی تهیه اسمیر از زخم بیمار و رنگ‌آمیزی با رنگ گیمسا است(7). اما از نقاط ضعف این روش می‌توان به عدم تشخیص گونه‌های انگل، حساسیت پایین آن در تشخیص موارد مثبت و منفی در مرحله مزمن بیماری، نیاز به دقت و مهارت بالا در تشخیص نمونه‌هایی با تعداد کم انگل اشاره کرد که مجموع این عوامل استفاده از این روش را تا حدودی با مشکل روبرو ساخته است(9،8).

در مطالعه فخار و همکاران، حدود 56 درصد اسمیرهای منفی از نظر میکروسکوپی، با روش PCR مثبت شدند(10). پازوکی و همکاران طی مطالعه ای بر روی اشکال لوپوئید سالک گزارش نمودند که اسمیرهای مستقیم تهیه شده از این بیماران همگی منفی بودند و تنها با استفاده از روش PCR بر روی اسمیرهای منفی، انگل *لیشمانیا تروپیکا* شناسایی شد(1). در مطالعه محقق و همکاران، شناسایی مولکولی گونه لیشمانیا با استفاده از اسمیرهای منفی صورت گرفت که از میان81 بیمار مبتلا به ضایعات پوستی با اسمیر منفی تعداد 9 بیمار (11/1 درصد) با روش PCR مثبت شدند که گونه تمامی آن ها *لیشمانیا تروپیکا* شناسایی شد(12).

در مطالعه پقه و همکاران، در استان گلستان که با انجام روش PCR بر روی 65 گسترش مستقیم فاقد جسم

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]

لیشمن، انجام گرفت، در تعداد 34مورد (52/3درصد)، DNAکینتوپلاست انگل *لیشمانیا* شناسایی شد(13). هم‌چنین کرمیان و همکاران، این روش را در شناسایی موارد غیرمعمول و مزمن بسیار کارآمدتر از روش مستقیم اعلام نمودند(14). از آن‌جایی‌که در بسیاری از موارد اسمیر مستقیم زخم‌های غیر معمول و مزمن، منفی گزارش می‌شود و این روش از حساسیت پایینی برخوردار است و از سوی دیگر PCR دارای حساسیت بالایی است، لذا پیشنهاد می‌شود در صورت مشکوک بودن به بیماری به ویژه در مناطق آندمیک، به منظور تشخیص دقیق‌تر و یا رد آن، لزوماً ازروش PCR استفاده شود(19-15).

در مورد کارآیی روش PCR در مطالعه حاضر مشخص شد در 15درصد از مواردی که نتیجه آزمایش مستقیم منفی بوده است با روش PCR مثبت شده است. لذا این روش به منظور تشخیص دقیق و به موقع بیماری و جلوگیری از موارد منفی کاذب توصیه می‌شود(20-18). نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که انجام آزمایش مستقیم میکروسکوپی برای تشخیص لیشمانیوز پوستی در مناطق آندمیک به اندازه کافی قابل اعتماد نیست. علاوه بر این انجام PCR بر روی اسمیر منفی افراد مشکوک به لیشمانیوز پوستی به منظور درمان به موقع و مناسب‌تر توصیه می‌شود.

سپاسگزاری

به این وسیله از کلیه همکاران مرکز بهداشت بم به خاطر همکاری‌های ارزشمندشان قدردانی می‌شود. این مطالعه حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی 2105 با کد اخلاق IR.MAZ.REC.95.2105 دانشگاه علوم پزشکی مازندران می‌باشد. از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران به خاطر تأمین هزینه‌های مالی تشکر می‌نماییم.

References

1. WHO (World Health Organization). First WHO report on neglected tropical diseases 2010: Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. WHO/HTM/NTD/2010.1. Geneva: WHO; 2010. Available from: http://www.who.int/neglected_diseases/2010report/NTD_2010report_embargoed.pdf. October 20, 2010.
2. Shirzadi MR, Gouya MM. National Guidelines for cutaneous leishmaniasis surveillance in Iran. Ministry of Health and Medical Education. Zoonoses Control Department, Tehran Iran 2012; 1-78 (Persian).
3. Al-Jawabreh A, Schoenian G, Hamarsheh O, Presber W. Clinical diagnosis of cutaneous leishmaniasis: a comparison study between standardized graded direct microscopy and ITS1-PCR of Giemsa-stained smears. Acta Trop 2006; 99(1): 55-61.
4. de Vries HJ, Reedijk SH, Schallig HD. Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. Am J Clin Dermatol 2015; 16(2): 99-109.
5. Ziaei Hezarjaribi H, Taghavi M, Fakhar M, Gholami S. Direct diagnosis of Trichomonas vaginalis infection on archived pap smears using Nested PCR. Acta Cytol 2015; 59(1): 104-108.
6. Lauchaud L, Marchergni-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. Comparision of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. J Clin Microbiol 2002; 40(1): 210-215.
7. Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]

samples. Diagn Microbiol Infect Dis.Diagn Microbiol Infect Dis 2003; 47(1): 349-358.

8. Pazoki-ghohe H, Haghparast-kenari B, Fakhar M. Current and novel laboratory diagnostic methods and identification of causative agents for cutaneous leishmaniasis. J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 25(132): 350-366 (Persian).
9. Mirahmadi H, Rezaee N, Mehravaran A, Heydarian P, Raeghi S. Detection of species and molecular typing of Leishmania in suspected patients by targeting cytochrome b gene in Zahedan, southeast of Iran. Vet World 2018; 11(5): 700-705.
10. Fakhar M, Mikaeili F, Hatam GR, Habibi P, Karamian M, Motazedian M, et al. A molecular epidemiology survey of cutaneous leishmaniasis in patients referring to Parasitology Lab at Shiraz School of Medicine and the importance of PCR assay. J Jahrom Univ Med Sci 2010; 8(1): 2-6 (Persian).
11. Pazoki H, Fakhar M, Rasooli A, Karamian M, Nazar E. Lupoid leishmaniasis among the known cases of cutaneous leishmaniasis in Herat Province, western Afghanistan. J Infect Public Health. 2016; 9(5):557-563.
12. Mohaghegh MA, Fata A, Salehi GH, Berenji F, Bazzaz MM, Rafatpanah H, et al. Molecular identification of leishmania species using samples obtained from negative stained smears. Iranian J Parasitol 2013; 8(2): 337-341 (Persian).
13. 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 Gonbad-e-Qabus from Golestan Province using specific PCR. J Mazandaran Univ Med Sci 2012; 21(suppl 1): 84-92 (Persian).
14. 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.
15. Jombo GT, Gyoh SK. Unusual presentations of cutaneous leishmaniasis in clinical practice and potential challenges in diagnosis: A comprehensive analysis of literature reviews. Asian Pac J Trop Med 2010; 3(11): 917-921.
16. Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. J Clin Microbiol 2006; 44: 1435-1439.
17. Motazedian H, Karamian M, Noyes HA, Ardehali SD. DNA extraction and amplification of *Leishmania* from archived, Giemsa-stained slides, for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis by PCR. Ann Trop Med Parasitol 2002; 96(1): 31-34 (Persian).
18. 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.
19. 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.
20. Fakhar M, Motazedian MH, Daly D, Lowe CD, Kemp SJ, Noyes HA. An integrated pipeline for the development of novel panels of mapped microsatellite markers for *Leishmania donovani* complex, *Leishmania braziliensis* and *Leishmania major*. Parasitol 2008; 135(5): 567-574.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]