REVIEW ARTICLE

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

Hossein Pazoki-ghohe[1],
Beheshteh Haghparast-kenari[1],
Mahdi Fakhar[2]

[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).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-12]

مجـلـــه دانـشـگاه عـلـــوم پـزشـکـــی مـازنـــدران
دوره بیست و پنجم شماره ۱۳۲ دی سال ۱۳۹۴ (۳۶۱-۳۴۵)

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 سالیانه عوارض اقتصادی- اجتماعی بسیاری برجوامع بشری تحمیل می کند. در میان روش‌های تشخیصی، روش‌های میکروسکوپی و یا کشت به عنوان روش‌های 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 دسترس‌ترین روش برای تشخیص لیشمانیوز پوستی در نظر گرفته می‌شود. روش‌های مختلفی با حساسیت بالاتر برای تشخیص این بیماری معرفی شده‌اند. در این میان می‌توان به روش میکروکالچر اصلاح شده اشاره نمود که دارای حساسیت ۹۸/۴ درصد و ویژگی ۱۰۰ درصد می‌باشد. در میان سایر روش‌ها، روش‌های مولکولی و بیوشیمیایی متنوعی برای شناسایی و تعیین هویت (تایپینگ) انگل لیشمانیا طراحی شده‌اند که روش بررسی الگوهای ایزوآنزیمی (زایمودم‌ها) به عنوان استاندارد طلایی تایپینگ و روش جایگزین آن روش میکروستلایت پیشنهاد شده است. اخیرا روش‌های نوینی مانند روش‌های تک دمایی LAMP با ویژگی بالا و یا NASBA و HRM نیز مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند. در مقاله حاضر، روش‌های تشخیصی رایج و نوین لیشمانیوز پوستی با جزئیات بیشتر مرورشده‌اند.

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

مقدمه

لیشمانیوز پوستی یک بیماری انگلی است که توسط تک یاخته جنس لیشمانیا ایجاد می‌شود و بسته به گونه‌های آن و پاسخ ایمنی میزبان اشکال بالینی مختلفی ایجاد می کند. انتقال بیماری از طریق گزش پشه‌خاکی ماده آلوده (زیرخانواده فلبوتومینه) اتفاق می‌افتد. زخم‌ها اغلب در قسمت‌های بدون پوشش بدن ایجاد می‌شوند(۱). این بیماری گسترش جهانی دارد و بیشتر در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان و کشورهای حوزه مدیترانه شایع است(۲). این بیماری یکی از مهم‌ترین و شایع‌ترین بیماری‌های بومی ایران و دومین بیماری انگلی منتقله توسط حشرات بعد از مالاریا می‌باشد. دو فرم شایع لیشمانیوز پوستی در ایران عبارتند از نوع شهری و نوع روستایی که هر کدام از این دونوع دارای کانون‌های متعددی در کشور می‌باشند(۴،۳). شکل تیپیک لیشمانیوز پوستی به صورت پاپول، ندول پوسته سخت، پلاک یا ندول زخم شده ظاهر می‌شود و اشکال

مولف مسئول: مهدی فخار- ساری: کیلومتر ۱۸ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی E-mail: mahdif53@yahoo.com
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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-12]

غیرتیپیک این خصوصیات را نداشته و ممکن است با سایر بیماری‌های پوستی اشتباه شوند(۶،۵). لیشمانیوز باید جزء تشخیص افتراقی زخم‌های مزمن پوستی در افراد با سابقه مسافرت به مناطق اندمیک قرار گیرد(۱). با علایم بالینی نمی‌توان ابتلا به لیشمانیوز پوستی را تایید نمود(۷). در کشورهای اندمیک و غیراندمیک زخم‌های ابتدایی لیشمانیوز پوستی در اغلب موارد با سایر بیماری‌های پوستی از جمله زخم‌های گرمسیری، زرد زخم، گزش حشرات آلوده، جذام، لوپوس ولگاریس، مرحله سوم سیفلیس، بیماری اسپیروکتی یاز (Yaws)، بلاستومایکوزیس، پاراکوکسیدیوئیدومایکوزیس، توبرکلوزیس پوستی، اسپوروتریکوزیس پوستی، مایکوباکتریوزیس غیرتیپیک و سرطان پوست اشتباه می‌شوند(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 روش‌های تشخیص آزمایشگاهی ضروری است(۱۰). در مقاله حاضر انواع روش‌های تشخیصی و تعیین هویت عوامل ایجادکننده لیشمانیوز پوستی مرور شده است که شامل روش‌های پارازیتولوژی، ایمونولوژی، مولکولی، بیوشیمیایی و روش‌های نوین می‌باشند (جدول شماره۱).

۱- روش‌های تشخیص آزمایشگاهی

۱- ۱ روش های پارازیتولوژیکی(انگل شناسی)

الف- روش تهیه گسترش مستقیم(Direct smear):

تشخیص لیشمانیوز پوستی(CL) معمولاً با آزمایش مستقیم نمونه‌های حاصل از خراشیدن کف زخم (پس از ایجاد شکاف در حاشیه پوست) یا کشیدن مایع سروزیته داخل ضایعات پوستی [Fine needle aspiration(FNA)] و یا بیوپسی ضایعات پوستی انجام می شود. اگر ضایعه مزمن باشد، چون ضایعات معمولا خود محدود شونده هستند، برای مشاهده انگلکمی دیر شده است و معمولاً اگر ضایعه دارای یک حاشیه قرمز فعال باشد نمونه‌گیری مناسب‌تر است. نمونه‌گیری از ضایعه مشکوک باید با آسپیراسیون و خراشیدن (هر دو به طور مستقیم از زخم) و یا بیوپسی (معمولا با یک ابزار بیوپسی مثل پانچر ۴ میلی‌متری) توسط افراد با تجربه انجام شود. در غیر این صورت، نتایج ضعیف و بیمار دچار عوارض خواهد شد. در میان روش‌های مذکور، بیوپسی مناسب‌ترین روش است اما از بعضی ضایعات (روی انگشت، گوش یا صورت) نمی‌توان بیوپسی گرفت که باید از آسپیره نمودن و یا خراشیدن استفاده نمود. معمولاً باید دو بیوپسی ۴ میلی‌متری 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

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

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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-12]

جلوگیری می‌شود. در هنگام نمونه‌گیری از ترکیبات حاوی ید مانند بتادین، به دلیل اختلال در انجام PCR، نباید استفاده شود. برای تهیه گسترش‌های تماسی (Impression smear)، یکی از بیوپسی‌ها 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، نمونه‌گیری باید تکرار شود(۱۰،۸،۷،۵،۲،۱). برای تهیه گسترش مستقیم می‌توان از تیغ بیستوری کند، لانست سر کند و Dental broaches (نوعی ابزار در دندانپزشکی) نیز استفاده نمود(۱۱).

گسترش‌ها بعد از خشک شدن در دمای آزمایشگاه و فیکس نمودن با متانول خالص با رنگ‌های رومانوفسکی مانند گیمسا (ترجیحاً رقیق شده با بافر دارای PH=7.2) رنگ آمیزی می‌شوند. با این رنگ سیتوپلاسم انگل به رنگ آبی کم رنگ، هسته و کینتوپلاست به رنگ صورتی- بنفش مشاهده می‌شود(۷). در زیر میکروسکوپ نوری اجسام لیشمن که ۴-۲ میکرومتر و گرد و یا بیضی هستند معمولاً در ماکروفاژها دیده می‌شوند، ولی در خارج از ماکروفاژ نیز ممکن است مشاهده شوند. حساسیت این روش ۸۸/۸-۶۴ درصد و ویژگی آن ۱۰۰درصد گزارش شده است(۱۲،۱۰) 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 می‌رسد که تشخیص بالینی ضایعات تیپیک CL توسط متخصص پوست، در مناطق اندمیک، قابل قبول باشد(۱۳). هم‌چنین آن‌ها می‌توانند با استفاده از یک ابزار کاربردی و غیر تهاجمی تشخیصی به نام فتوگرافی در روش در موسکوپی (Dermoscopy) و مشاهده ساختارهایی که اختصاصی ضایعات پوستی CL می‌باشند، از جمله اشکال سفید رنگ ستاره‌ای 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 میکروسکوپ‌های 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 نمونه‌های ضخیم در عمق‌های مختلف است(۱۴).

ب- روش کشت (Culture method): قبل از نمونه گیری برای کشت، ضایعه و پوست اطراف آن با الکل اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی می‌شوند و بعد از خشک شدن نمونه گیری انجام می‌گیرد(۱۵). نمونه‌های به دست آمده ازخراشیدن، بیوپسی و آسپیره نمودن برای کشت استفاده می‌شوند. بعضی از گونه‌های لیشمانیا را به سختی می‌توان در محیط‌های کشت جدا کرد. محیط‌های Novy-MacNeil-Nicole(NNN)، Brain–heartinfusion(BHI)، Evan's Modified Tobie's (EMTM)، Grace's، محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰درصد 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 پراکندگی 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 گونه‌ها و بررسی مقاومت دارویی استفاده می‌گردد(۱۹). Allahverdiyev و همکاران (۲۰۰۴) در ترکیه یک روش کشت میکروکپیلاری [Microcapillary Culture Method (MCM)] برای تشخیص CL معرفی کرده‌اند. این روش در مقایسه با

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-12]

کشت رایج، سریع، ساده و مقرون به صرفه است و حساس‌تر 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 تائیدی برای تشخیص دقیق و معتبر CL برای بیماران به ویژه بیماران با اسمیر منفی در مناطق اندمیک پیشنهاد کرده اند(۱۲).

ج- روش تلقیح به‌حیوان حساس آزمایشگاهی: تزریق به حیوانات بیش‌تر دربررسی 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 لیشمانیوز پوستی 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 ائوزینبه عنوان یک روش تائید تشخیص بیماری می‌باشد. هیستوپاتولوژی CL دارای تنوع زیادی است، اما یک الگوی غالب با حضور گرانولومای بدون نکروز را نشان می‌دهد(۸). براساس مطالعه آینده نگر Uthman و همکاران (۲۰۰۵) در عربستان سعودی ممکن است چهار حالت مجزا مشاهده شود(۲۲). نوع A که ماکروفاژها به شدت آلوده و واکوئوله با لنفوسیت‌های کم است. این نوع مرتبط با یک پاسخ ایمنی اولیه یا یک لیشمانیوز پوستی منتشر آنرژیک است. نوع B و C یک پاسخ التهابی همراه با یا بدون نکروز است و بیش‌ترین انواع را درCL 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 لیشمانیوز 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 ۱۰۰درصد است. بایدتوجه داشت که روش‌های سیتولوژی و پاتولوژی حساسیت کافی برای تشخیص اشکال غیرتیپیک CL را ندارند(۵). حساسیت روش سیتولوژی در فرم تیپیک CL، ۷۹درصد و در فرم غیر تیپیک، ۵۸ درصد و ویژگی آن ۱۰۰درصد 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 لیشمانیوز پوستی معرفی شده است(۲۳).

۱-۳.روش های ایمونولوژیک

الف- شناسایی آنتی بادی(Antibody detection): اگرچه روش‌های سرولوژی مختلفی معرفی شده‌اند اما به‌طورکلی در لیشمانیوز پوستی و پوستی- مخاطی به علت پاسخ ضعیف ایمنی هومورال و درنتیجه تولید کم آنتی بادی‌ها روش‌های سرولوژی کاربرد زیادی ندارند.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-12]

از سوی دیگر، معایبی هم‌چون واکنش‌های متقاطع و عدم تفکیک عفونت‌فعلی ازعفونت قبلی وعدم توانایی تشخیص گونه انگل بر کم اهمیت بودن این روش می‌افزاید(۷). ایمونوفلورسانس غیر مستقیم و الیزا از روش‌های سرولوژی رایج‌تر می‌باشند، اما این روش‌ها در تشخیص لیشمانیوز پوستی، در دنیای قدیم به علت حساسیت کم و واکنش متقاطع با دیگرعفونت‌ها، از روش‌های رایج نیستند. درواقع، این روش‌ها (به ویژهIFA) ممکن است محدودیت‌هایی مانند عیار کم آنتی‌بادی و یا عدم شناسایی آن، یا غیرقابل جداسازی آنتی‌بادی، عدم تفکیک عفونت حاد از مزمن و همچنین حضور واکنش متقاطع با دیگر گونه‌ها را ایجاد نمایند. نتایج مثبت کاذب در بیماران مبتلا به تریپانوزومیازیس، توکسوپلاسموزیس یا پاراکوکسیدیوئیدومایکوزیس و حتی در افراد سالم دیده شده است(۸). این محدودیت‌ها منجر به گسترش روش‌های جدید ایمونولوژی برای شناسایی آنتی بادی مانند فلوسایتومتری، وسترن بلات و الایزا شدند(۲۵،۲۴). 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 می‌باشد. حساسیت و ویژگی مناسب این روش نشاندهنده قابل استفاده بودن آن در تشخیص این بیماری، به علاوه در بررسی‌های سرواپیدمیولوژیکی، و پیگیری بیماران درمان شده می‌باشد(۲۶). هم‌چنین Celeste روش ELISA-L.infantum-rHsp83 را به علت حساسیت و ویژگی بالا و واکنش متقاطع ناچیز با دیگر بیماری‌های عفونی به عنوان یک روش سرولوژی برای تایید تشخیص عفونت لیشمانیا پیشنهاد کرد(۲۷). ارزیابی anti-live (ALPA-IgG) و anti-fixed (AFPA-IgG) *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* promastigote IgG، با فلوسایتومتری 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 آنتی‌ژن 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 ماژور می‌تواند باشد(۲۹). هم‌چنین آنزیم‌های Fe-SOD خالص مترشحه به وسیله لیشمانیا پروویانا و لیشمانیا آمازونسیس 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 داشتهاند(۳۰).

ب - شناسایی آنتی ژن(Antigen detection): این روش نسبت به روش‌های شناسایی آنتی‌بادی اختصاصی‌تر است و دارای خصوصیاتی همچون تشخیص زودرس بیماری، عدم واکنش‌های متقاطع و استفاده در افراد با نقص و یا ضعف ایمنی مانند افراد مبتلا به ایدز می‌باشد(۳۱). در روش فلورسانت آنتی‌بادی مستقیم (Direct Fluorescent Antibody) برای شناسایی آنتی‌ژن انگل در مقاطع بافتی و یا گسترش‌ها از آنتی‌بادی کونژوگه با رنگ فلورسنت به عنوان ردیاب (probe) استفاده می‌شود. این روش در تشخیص لیشمانیوز پوستی، پوستی- مخاطی و لیشمانیوز پوستی پس از کالاآزار (PKDL) مناسبتر است. به جای رنگ فلورسنت از [Horse Radish Peroxidase (HRP)] می‌توان برای اتصال به آنتیبادی استفاده کرد که در این صورت به میکروسکوپ فلورسانت نیاز نخواهد داشت و اسلایدهای رنگ شده می‌توانند برای مدت طولانی نگهداری شوند(۷).

ج- آزمون پوستی(Skin testing): ازدیاد حساسیت تاخیری یک ویژگی مهم اشکال لیشمانیوز پوستی است و با آزمون پوستی لیشمانین(LST) اندازه‌گیری می‌شود که نام دیگر آن واکنش مونته نگرو می‌باشد. این آزمون

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-12]

واکـنش متقـاطع بـا بیمـاری شـاگاس نـدارد، امـا بـا توبرکلـوزیس گرانـولار و جـذام واکـنش متقـاطع دارد. LST به عنوان یک شاخص برای شیوع لیشـمانیوز پوسـتی، پوسـتی- مخـاطی در انسـان و حیـوان، و درمـان موفـق کالاآزار است. اساس این آزمـایش کـه ارزیـابی ایمنـی سلولی است، بیش‌تـر در مطالعـات اپیـدمیولوژی وتعیـین میزان آندمیسیته بیماری استفاده می‌شود. این روش شامل تزریـق داخـل جلـدی ۰/۱ میلـی‌لیتـر آنتـی‌ژن اسـتاندارد (لیشمانیا) در قسمت قدامی ساعد است که بعد از حـدود ۴۸ یا ۷۲ ساعت خوانده می‌شود. برجستگی سفت ایجـاد شده، برابر یا بیش‌تر از ۵ میلی‌متر، مثبـت در نظـر گرفتـه می‌شود. معمولاً ۳ تا ۴ ماه بعد از بـروز ضـایعات پوسـتی آزمایش مثبت می‌شـود. اگرچـه ایـن آزمـون حساسـیت حدود ۹۰ درصد در مـوارد لیشـمانیوز پوسـتی- مخـاطی دارد، ولی در تشخیص لیشمانیوز پوستی دنیای قـدیم بـه جز اشکال لوپوئید زیاد کاربرد ندارد زیـرا ممکـن اسـت موارد منفی کاذب در لیشمانیوز پوستی آنرژیـک منتشـر (DCL) و در موارد لیشمانیوز پوستی کم‌تـر از یـک مـاه اتفاق بیافتد. معمولاً این آزمون در ۹۵-۸۰ درصد مـوارد ابتلاء به لیشمانیوز مثبت می‌شـود. عـلاوه بـر ایـن ممکـن است نتایج مثبت کاذب در افراد ساکن منـاطق انـدمیک به خاطر ابتلاء به عفونت‌هـای تحـت بـالینی یـا بـه علـت عفونت قبلی ایجاد شود زیرا این آزمون در طـول حیـات فرد مثبت می‌ماند. هـم‌چنـین ایـن تسـت مـی‌توانـد بـرای تشخیص مسافران مناطق غیر اندمیک مفیـد باشـد(۸). در مطالعـــه هاشـــمی و همکـــاران (۲۰۱۱) دو روش میکروسکوپی و مونته نگرو مقایسه شدند و میزان تطـابق (agreement) میان دو روش ۸۷/۹ درصد بـود. بـا توجـه به نتایج این مطالعه به نظر می‌رسد کـه بتـوان LST را بـه عنوان یک روش تشخیصی مناسب در مواقعی که شـک زیادی بـه لیشـمانیوز پوسـتی وجـود دارد امـا اسـمیر منفـی اسـت، معرفـی کـرد(۳۲). در مجمـوع، LST در انـواع لیشمانیوز پوستی به خصوص اشـکال لوپوئیـد، پوسـتی- مخـاطی، مخـاطی و PKDL (متغیـر) مثبـت و در مـوارد لیشـمانیوز پوسـتی منتشـر (DCL)، عفونـت تـوام ایـدز و لیشمانیوز منفی خواهد شد.

۲- روش های شناسایی انگل لیشمانیا

۲-۱. روش های مولکولی

روش‌های مولکولی بـه ویـژه در مـوارد تـراکم کـم انگل و ضایعات غیر تیپیک قابل اشتباه با سایر عفونت‌هـا بسیار با ارزش بوده و ویژگی و حساسیت آن‌هـا بـیش از ۹۵ درصد است. باید به این نکته توجه داشت که اگرچه روش‌های مولکولی مختلفی بـرای تشـخیص و شناسـایی گونه‌های لیشمانیا معرفـی شـده‌انـد، امـا ایـن روش‌هـا بـه خاطر پر هزینه بودن و نیاز به پرسنل با تجربه و تجهیزات پیشـرفته زیـاد مـورد اسـتفاده قـرار نمـی‌گیرنـد(۳۵-۳۳). لیشمانیوز پوستی مزمن اغلب به صورت غیرتیپیک بـروز مـی‌کنـد و بـه آسـانی بـا سـایر زخـم‌هـای مـزمن اشـتباه می‌شـود. ایـن بیمـاران اغلـب دارای تیتـر کـم یـا بـدون آنتی‌بادی می‌باشند. بنـابراین، روش‌هـای سـرولوژی نیـز بـرای تشـخیص کـاربرد ندارنـد. در چنـین مـواردی، روش‌هـای مولکـولی بـه عنـوان مهـم‌تـرین ابـزار بـرای تشخیص خواهند بود(۷).

الـف- روش‌هـای رایـج واکـنش زنجیـره ای پلیمـراز [Polymerase chain reaction (PCR)]:

نمونه‌های مختلف بالینی مانند بیوپسی پوستی، نمونه حاصل از خراشیدن ضـایعات از کـف زخـم، بـه عـلاوه اگزودا و مایع آسپیراسیون ضایعات پوستی بـرای تشـخیص دراین روش استفاده می‌شوند. DNA کینتوپلاست انگـل لیشمانیا از دو قسمت حلقـه‌هـای کوچـک و حلقـه هـای بزرگ تشکیل شده است که حلقـه‌هـای کوچـک خـود دارای دو بخش ثابت و متغیـر هسـتند. اسـتفاده از DNA کینتوپلاست (KDNA) انگل لیشمانیا برای تشخیص بسـیار کاربردی است. از توالی‌های متغیر موجود در حلقه‌هـای کوچک DNA کینتوپلاست برای تشـخیص گونـه‌هـای مختلـف لیشـمانیا و از توالی‌هـای ثابـت بـرای تشـخیص

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-12]

جنس لیشمانیا استفاده می‌شود(۳۸-۳۶). KDNA لیشمانیا را می‌توان 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). اخیرا روش نمونه‌گیری با استفاده از سوآب پنبه‌ای برای تشخیص لیشمانیوز پوستی با PCR بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد. جمع‌آوری اگزودا با سوآب، برای بیمار و هم‌چنین نمونه‌گیر، آسان، بدون درد و راحت‌تر است. هم‌چنین سوآب پنبه‌ای اثرات مهارکنندگی بر PCR ندارد. اگزودا جمع‌آوری شده به عنوان یک جایگزین نمونه‌های بیوپسی، به ویژه در شرایط فیلد، پیشنهاد می‌شود(۴۰). از کاغذهای واتمن FTA (Flinders Technical Association) نیز برای نمونه‌گیری مستقیم از ضایعات بیماران در مطالعه اپیدمیولوژیک لیشمانیوز پوستی استفاده می‌شود. جمع‌آوری مستقیم نمونه با استفاده از کاغذ FTA امکان آلودگی ایزوله‌های لیشمانیا در طول پاساژهای کوتاه و بلند مدت کشت در آزمایشگاه و نارضایتی حاصل از گرفتن بیوپسی از بیمار را کاهش می‌دهد(۴۱). استفاده از FTA برای جمع‌آوری 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 نوکلئیک‌های مختلف در PCR می‌توان استفاده کرد. اهداف ژنی مهم شامل 18s-rRNA، زیر واحد کوچک rRNA (SSU rRNA)، توالی ژنی تکرار شونده مانند DNA میکروستلایت‌ها، نواحی ITS کینتوپلاستی، جایگاه ژنی gp63، ناحیه ژنی ß-tubulin و cytochrome b12 (miniexon) می‌باشند(۴۷،۷-۴۳). ویژگی و حساسیت روش PCR در اغلب تحقیقات به ترتیب ۱۰۰درصد و ۹۸-۹۲ درصدگزارش شده است(۴۸). درمطالعه 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 حساسیتPCR ، 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 ۱۰۰درصد 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 روش‌های معمولی منفی گزارش شده‌اند(۴۹). در مقایسه سه روش PCR/KDNA ، PCR/7SLRNA و PCR/ITS1 بر روی بیماران مشکوک به لیشمانیوز پوستی، حساس‌ترین روش PCR/KDNA (۹۱/۸درصد) بوده است، اما در شناسایی گونه‌های لیشمانیا ویژگی پایینی دارد. حساسیت PCR/7SLRNA و PCR/ITS1 به ترتیب ۹۰/۵ درصد و ۶۳/۵ درصد و ویژگی هر دو ۱۰۰درصد گزارش شده است. 7SLRNA محتوای RNA مربوط به کمپلکس نوکلئوپروتئینی (signal recognition particle) می‌باشد که در شناسایی پروتئین‌های اختصاصی و ارائه آن‌ها به شبکه اندوپلاسمی در یوکایوت‌ها و غشائ سلولی در پروکاریوت‌ها 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 گونه‌های لیشمانیا با حساسیت و ویژگی بالا می‌باشد(۵۱،۵۰). در مطالعه‌ای که به وسیله Bousslimi و همکاران (۲۰۱۴) صورت گرفت، PCR-RFLP با تکثیر ناحیه ITS1، DNA ریبوزومی و هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم محدودالاثر HaeIII، با الکتروفورز ایزوآنزیم از نمونه‌های کشت مثبت در محیط کشت NNN، برای تشخیص گونه‌های لیشمانیا مقایسه گردید. تکنیک PCR-RFLP به دلیل سادگی، سرعت و توانایی اجرا بر روی نمونه‌های بالینی در تشخیص گونه‌های لیشمانیا پیشنهاد شده است(۵۲). تکنیک دیگر PCR-FFL(Fluorescent Fragment Length) می‌باشد

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-12]

که در این روش از پرایمرهای متصل به رنگ فلورسانت کـه بـرای منـاطق 7SL و rRNA ITS-1 طراحـی شـده، استفاده می‌گردد. مقایسه این روش با PCR-RFLP نشان داد کـه PCR-FFL (دارای حساسـیت ۸۳/۳ درصـد در ITS-1 و حساسیت ۹۴/۴ درصد در 7SL) روشی دقیـق، سریع و حساس‌تر از PCR-RFLP (به ترتیـب حساسیت ۷۵ درصـد و ۸۰/۶ درصـد) مـی‌باشـد(۵۳). در میـان روش‌های تایپنگ انگـل لیشـمانیا، روش میکروسـتلایت (MLMT: Multilocus Microsatellite Typing) ابـزاری دقیق، سریع و قابل اعتمـاد بـرای مطالعـات اپیـدمیولوژی مولکولی و ژنتیک جمعیت گونه‌هـای مختلـف لیشـمانیا بوده و جایگزین بسیار مناسبی برای روش ایزوآنـزیم در طبقه‌بندی و تعیین سوش این انگل‌هـا مـی‌باشـد. در ایـن روش میزان هتروژنیسیتی و تنوع آللـی در لوکـوس‌هـای پلی مورفیک را می‌توان شناسایی نمود. از ویژگـی‌هـایی این روش می‌توان بـه عـدم نیـاز بـه کشـت انبـوه، سـاده، ارزان و قابل انجـام بـودن بـر روی نمونـه‌هـای کلینیکـی اشاره نمود(۳). در میان روش‌های مختلـف، روش Real-time PCR، بـا هـدف kDNA minicircles، بـرای شناسایی گونه‌ها دارای حساسیت بـالایی اسـت. عـلاوه بـر ایـن، PCR/ITS-1، هضـم آنزیمـی بـا HaeIII و یـک الگـوریتم ترکیبـی شـامل PCR/hsp70 و RFLP نیـز از مناسب‌ترین روش‌ها برای شناسایی گونه‌ها می‌باشند(۵۴). تکنیـــک‌هـــای Nested-PCR و ایمونوهیستوشـــیمی تست‌های حساس برای تشـخیص اشـکال تیپیـک و غیـر تیپیک لیشمانیوز پوسـتی هسـتند و بـه عنـوان روش‌هـای تکمیلی در موارد مشکوک دارای نتـایج میکروسـکوپی منفـی مـی‌باشـند. در مطالعـه شـیریان (۲۰۱۴) روش Nested-PCR با هدف تکثیر قطعه متغیـر در minicircles از DNA کینتوپلاست، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی گونه LIN R4-LIN17-LIN19، برای تشخیص گونه‌هـای لیشمانیا استفاده شد(۵).

روش‌هـــای مولکـــولی بـــا اســـتفاده از پرایمرهـــای اختصاصی، دقیق‌تر، حساس‌تـر و اختصاصـی‌تـر از روش میکروسـکوپی، کـه روشـی زمـان بـر و نیـاز بـه میکروسکوپیست با تجربه دارد، می‌باشند(۵۵) یک روش RFLP نیز بـا اسـتفاده از آنـزیم محـدودالاثر BsuRI بـر روی نمونه‌های بیماران در ترکمن صحرا واقع در شـمال شرقی ایران به عنوان روش اختصاصی گونه معرفی شـد. با این روش برای اولین بار *لیشمانیا تورانیکا* انگـل مـوش بزرگ صحرایی در انسان گزارش شد(۵۶). تکنیـک دیگـر Multiplex PCR می‌باشـد کـه از ایـن روش بـرای تشخیص سریع گونه‌های مختلف لیشمانیا استفاده می‌شـود. از ایـن روش بـرای تشـخیص لیشـمانیوز پوسـتی دنیـای 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 ازپرایمرهای اختصاصی است(۵۸). محصول تکثیرشده بدون نیاز به الکتروفورز و لامپ UV، با اضـافه کـردن معـرف فلورسانس [Fluorescent detection reagent (FDA)] قبل از تکثیر، قابـل مشـاهده اسـت. از دیگـر مزایـای آن عدم نیاز به دستگاه ترموسایکلر میباشد (چون واکنش‌هـا در دمای ۶۵–۶۰ درجه سانتی‌گراد صورت می‌گیرنـد) و هم‌چنین ویژگی بالای آن به علت استفاده از ۶ پرایمر (۴ پرایمر اختصاصی گونه و ۲ پرایمر لوپ) است. تکنیـک Reverse Transcriptase Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) بـا هـدف ژن 18SrRNA، در تشخیص لیشمانیوز پوسـتی بـا اسـتفاده از نمونـه‌هـای بیوپسی حساسیت ۹۸ درصد را نشان داده است(۵۹).

۲ – *روش Nucleic acid sequence based assay (NASBA)*: این روش با تکثیـر RNA در یـک واکـنش ایزوترمال صورت می‌گیرد. کاربرد وسیع ایـن ابزارهـای نوین در تشخیص و کنترل لیشمانیوز به دلیل پیچیدگی و عدم فرمت استاندارد روند کندی دارد(۶۰،۶۱).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-12]

اخیراً OligoC-Test و NASBA-Oligochromatography (OC) به عنوان فرمت‌هایی مفید برای تشخیص مولکولی ساده در آینده، متناسب با استانداردها، برای انگل لیشمانیا معرفی شده‌اند(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 می‌کند(۶۱). تکنیک دیگر Quantitative nucleic acid sequence-based amplification (QT-NASBA) می‌باشد که در مطالعه Vander Meide و همکاران (۲۰۰۵) از این روش برای جداسازی انگل‌های لیشمانیا و هم‌چنین برای تعیین میزان تراکم (تعداد) انگل در نمونه‌های بیوپسی پوست بیماران استفاده شد. نتایج نشان داد که این روش یک روش معتبر، حساس و اختصاصی برای جداسازی انگل‌های لیشمانیا از نمونه‌های بیوپسی پوست است که از ویژگی و حساسیت زیادی برخوردار می‌باشد. هم‌چنین این روش توانایی تعیین مقدار کمی گونه‌های لیشمانیا دنیای جدید و قدیم در نمونه‌های بیوپسی پوست را دارا می‌باشد و می‌تواند 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 آنتی‌بادی‌ها می‌باشد(۳۱). اخیراً محققین از آپتامر به عنوان ابزاری قدرتمند برای شناسایی آنتی‌ژن اختصاصی لیشمانیا (H2A) و طراحی کیت‌های تشخیصی و یا روش‌های تشخیصی نوین و همچنین اهداف دارویی در بیماری لیشمانیوز استفاده می‌کنند. آپتامرها (Aptamer) اولیگونوکلئوتیدهائی تک زنجیره‌ای کوتاه با تمایل بسیار بالا برای اتصال به RNA یا DNA مولکول هدف خود می‌باشند. آن‌ها با اختصاصیت و تمایل بسیار بالا به واسطه ویژگی شکل ساختمان سوم خود به مولکول هدف متصل می‌شوند(۶۴).

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 می‌گردد که نتایج این داده‌ها را می‌توان برای غربالگری جهش، متیلاسیون و دیگر تحقیقات کاربردی استفاده کرد(۶۷-۶۵). در این روش از رنگ‌های فلورسنت (مانند ResoLight, EvaGreen, LC Green) استفاده می‌گردد که این رنگ‌ها توانایی اتصال به DNA دو رشته‌ای را دارند و به عنوان رنگ‌های بین لایه‌ای یا intercalating dye شناخته می‌شوند و در غلظت‌های بالا سبب مهار RCP نمی‌شوند. حساسیت این روش به اندازه‌ای است که می‌تواند جهش‌های ایجاد شده در حد چند باز را نیز شناسایی کند و بیش‌ترین کاربرد آن برای تعیین موتاسیون‌های نقطه‌ای و پلی‌مورفیسم تک نوکلوتیدی (SNP) می‌باشد. از مزایای روش HRM برای تشخیص بیماری لیشمانیوز می‌توان به مواردی همچون تشخیص اولیه بیماری در نمونه‌های بالینی مختلف، تشخیص گونه انگل به طور همزمان و برآورد میزان بار انگلی در نمونه‌های کلینیکی اخذ شده اشاره کرد. بنابر این، با انجام یک تست می‌توان 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 می‌باشد. علاوه بر بیماران مبتلا به لیشمانیوز پوستی می‌توان از این روش برای شناسایی انگل در ناقلین و مخازن نیز استفاده نمود(۶۸، ۶۹).

۲-۲ *روش های بیوشیمیایی*

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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-12]

(Multi locus enzyme electrophoresis) دارای قدرت تفکیک بالایی بوده و قادر است تنوع فراوان موجود در گونه‌های لیشمانیا را مشخص نماید. این روش بر اساس الکتروفورز ایزوآنزیم‌های لیشمانیا بر روی ژل‌های استات سلولز و پلی‌کریل آمید و تعیین زایمودم‌های 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 لیشمانیا، هنوز آنالیز زایمودمی به عنوان روش استاندارد طلایی برای تعیین هویت انگل و تایپینگ لیشمانیا مطرح است(۷۰،۶۵). در سال ۱۹۸۷ میلادی Awadalla و همکارانش (۱۹۸۷) در مصر توانستند چهار آنزیم GPI, MDH, MPI 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 درایجادتمایز بین سوش‌های ایجادکننده لیشمانیوز پوستی و احشایی معرفی نموده و قدرت آنزیم PGD ۶ 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 لیشمانیا معرفی شدند. در مطالعه حاضر، آنزیم‌های GPI و G6PD بیش‌ترین هتروژنتی و آنزیم NH2 بیش‌ترین هموژنیتی 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 GPI,MDH, 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 به‌کار رفته (پیوسته یا غیر پیوسته) و یا نوع ژل (ژل استات سلولز و یا ژل پلی آکریلامید) باشد که در اغلب مطالعات محققین از ژل استات سلولز به علت ارزان‌تر و آسان تر 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 PGM , GPI , G6PD, NH1, NH2 و MDH را برای تفکیک گونه‌های عامل لیشمانیوز 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 10^{10} انگل در میلی‌لیتر محیط کشت احتیاج است و این امر برای تشخیص بعضی سویه‌های کند رشد و تا حدی کم رشد مشکل ساز می باشد(۷۵).

در پایان می‌توان نتیجه گیری کرد که به طور کلی می‌توان گفت که هنوز روش استاندارد طلایی برای تشخیص لیشمانیوز 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 لیشمانیوز 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 لیشمانیا طراحی و پیشنهاد شده‌اند که در حال حاضر روش بررسی الگوهای ایزوآنزیمی به عنوان استاندارد طلایی تایپینگ و روش جایگزین آن روش میکروسلایت

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-12]

(بدون نیاز به کشت انبوه، ساده و ارزان) مطرح شده است. لذا محققین بایستی باتوجه به اهداف مطالعه خود یکی از روش‌های فوق یا تلفیقی از آن ها را استفاده نمایند.

References

1. Galluzzo C, Eperon G, Mauris A, Chappuis F. Old World cutaneous leishmaniasis. Rev Med Suisse 2013; 9(385): 990-995.
2. 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.
3. 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.
4. Yaghoahi-Ershadi M. Rodent control operations against zoonotic cutaneous leishmaniasis in rural Iran. Ann Saudi Med 2005; 25(4): 309-312.
5. 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.
6. 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.
7. Singh S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. Indian J Med Res 2006; 123(3): 311-330.
8. 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.
9. Yücel A, Günaşti S, Denli Y, Uzun S. Cutaneous leishmaniasis: new dermoscopic findings. Int J Dermatol 2013; 52(7): 831-837.
10. Swick B L. Polymerase chain reaction-based molecular diagnosis of cutaneous infections in dermatopathology. Semin Cutan Med Surg 2012; 31(4): 241-246.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. Alarcon I, Carrera C, Puig S, Malvehy J. In vivo Confocal Microscopy Features of Cutaneous Leishmaniasis. Dermatology 2014; 228(2): 121-124.
15. Pourmohammadi B, Motazedian M, Hatam G, Kalantari M, Habibi P, Sarkari B. Comparison of three methods for diagnosis

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-12]

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). Avalable 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, Mohebali M, Javadian I. Leishmania and leishmaniasis. First ed, Tehran, Iran, Center for Academic Publication, 2009.
22. Uthman MA, Satir AA, Tabbara KS. Clinical and histopatho- logical 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, Lonardoni 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, Lonardoni 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-12]

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, Mohebali M, Ahmadpoor E. Visceral Leishmaniosis (kala-azar). First ed Gorgan, Iran, Nouroozi Publisher, 2014.
32. Hashemi SN, Mohebali M, Mansouri P, Bairami A, Hajjaran 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, Mohebali 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-12]

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 coinfected with human immunodeficiency virus type 1. J Clin Microbiol 2001; 39(1): 357-361.
47. Wortmann G, Sweeney C, Houng 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, Mohebali 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 AbdaI, 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-12]

55. Azizi Koroush, Soltani Aboozar, Alipour Hamzeh. Molecular detection of<i> 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 Commitee 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-12]

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 Zymodems. 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-12]