ORIGINAL ARTICLE

Diagnosis and Molecular Typing of Leishmania in Patients with Cutaneous Leishmaniasis

Alisha Akia[1],
Yazdan Hamzavi[2]

[1] Associate Professor, Nosocomial Infections Research Center, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran
[2] Associate Professor, Department of Parasitology, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

(Received September 5, 2016 ; Accepted February 6, 2017)

Abstract

Background and purpose: Iran is one of the endemic focuses of cutaneous leishmaniasis (CL) in the world. The disease is commonly seen in some tropical regions of Kermanshah province (West of Iran). In this study, patients with CL were diagnosed and identified using RFLP-PCR and DNA sequencing.

Materials and methods: In this descriptive study all suspected cases of CL attended a clinic affiliated with Kermanshah University of Medical Sciences in 2015 were diagnosed by microscopic and molecular methods. The *Leishmania* species were identified by PCR-RFLP and genomic sequencing.

Results: There were 65 patients of whom 47 (72.3%) were detected as CL including 64.6% males and 35.4% females. Among the patients 49.2% were resided in Kermanshah, and 50.8% lived in other cities of the province. It was found that 47.7% of the patients had history of travel to other provinces in previous months. Leishman bodies were detected in 50.8% and 72.3% of the patients by microscopic observation and PCR technique, respectively. By RFLP-PCR, 14.9% and 84.1% of positive samples were identified as *Leishmania tropica* and *Leishmania major*, respectively. The PCR product sequences of 5 samples confirmed the results of PCR-RFLP in identification of the *Leishmania* species.

Conclusion: *Leishmania major* is the main cause of CL in Kermanshah province. PCR is believed to be more sensitive than microscopic method for detection of CL and RFLP-PCR is an appropriate technique for identification of *Leishmania* species.

Keywords: RFLP-PCR, cutaneous leishmaniasis, DNA sequencing

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 26 (146): 22-30 (Persian).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-08]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و ششم شماره ۱۴۶ اسفند سال ۱۳۹۵ (۳۰-۲۲)

تشخیص مولکولی و تعیین گونه انگل لیشمانیا در بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی

علیشا اکیا[1]
یزدان حمزوی[2]

چکیده

سابقه و هدف: ایران یکی از کانون‌های لیشمانیوز جلدی در جهان است. این بیماری در برخی مناطق گرمسیری استان کرمانشاه به طور معمول دیده می‌شود. در این مطالعه بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی شناسایی شده و با روش RFLP-PCR و تعیین سکانس DNA تعیین گونه شدند.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی تمامی بیماران مشکوک به لیشمانیوز جلدی مراجعه‌کننده به کلینیک دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه طی سال ۹۴، با روش میکروسکوپی و مولکولی شناسایی شدند. گونه‌های لیشمانیا با روش RFLP-PCR و تعیین سکانس ژنومی شناسایی شدند.

یافته‌ها: ۴۷ نفر (۷۲/۳ درصد) از ۶۵ بیمار بررسی شده، مبتلا به سالک بودند. به ترتیب ۶۴/۶ درصد و ۳۵/۴ درصد آن‌ها مذکر و مونث بودند. ۴۹/۲ درصد از بیماران ساکن کرمانشاه و ۵۰/۸ درصد ساکن شهرستان‌های دیگر استان بودند. ۴۷/۷ درصد بیماران سابقه مسافرت به استان‌های دیگر در چند ماه گذشته را داشتند. اجسام لیشمن به ترتیب در ۵۰/۸ درصد و ۷۲/۳ درصد از بیماران با روش میکروسکوپی و PCR شناسایی شدند. با روش RFLP -PCR، به ترتیب ۱۴/۹ درصد و ۸۴/۱ درصد از نمونه‌های مورد بررسی به عنوان لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا ماژور شناسایی شدند. تعیین توالی ژنومی انجام شده در ۵ نمونه از محصولات PCR، نتایج روش PCR- RFLP را در تعیین گونه های لیشمانیا تایید نمود.

استنتاج: لیشمانیا ماژور گونه غالب لیشمانیوز جلدی در استان کرمانشاه است. روش مولکولی PCR حساسیت بیش‌تری نسبت به روش میکروسکوپی در شناسایی بیماری سالک دارد و RFLP-PCR روش مناسبی برای شناسایی گونه‌های لیشمانیا می‌باشد.

واژه های کلیدی: RFLP-PCR، لیشمانیوز جلدی، تعیین سکانس DNA

مقدمه

لیشمانیوز جلدی (سالک) از بیماری‌های منتقله توسط پشه‌خاکی‌ها می‌باشد که جزء شش بیماری مهم انگلی جهان است(۲،۱) و ایران یکی از کانون‌های اندمیک آن می‌باشد. این بیماری در ایران به دو فرم مهم خشک (شهری) و مرطوب (روستایی) وجود دارد که به ترتیب توسط *Leishmania tropica* و *Leishmania major* ایجاد می‌شوند. این دو فرم از نظر اپیدمیولوژی، ویژگی‌های بالینی بیماری، مدت زمان بیماری، ناقلین و مخازن دارای

مولف مسئول: یزدان حمزوی- کرمانشاه: دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی E-mail: yhamzavi@gmail.com
۱. دانشیار، مرکز تحقیقات عفونت های بیمارستانی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
۲. دانشیار، گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۵/۶/۱۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۵/۶/۱۶ تاریخ تصویب : ۱۳۹۵/۱۱/۱۸

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-08]

تفاوت‌های اساسی می‌باشند(۳). سالک در برخی از استان‌های ایران از جمله اصفهان، خوزستان، گلستان، بوشهر و کرمان با درجات متفاوتی از اندمیستی و در بیش‌تر استانه‌ای کشور نیز به صورت پراکنده دیده می‌شود(۶-۳). در استان کرمانشاه با توجه به تنوع آب و هوایی و شرایط اکولوژیکی متفاوت، همه ساله شاهد تعداد قابل توجهی از بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی به خصوص در مناطق گرمسیری می‌باشیم. در برخی مناطق استان مانند قصر شیرین، سرپل ذهاب و اسلام‌آباد؛ کانون‌هایی از بیماری وجود دارد(۸،۷). در روش میکروسکوپی که در بسیاری از آزمایشگاهه ای ایران و جهان، روشی متداول برای تشخیص این بیماری می‌باشد، از سروز زخم بیمار مشکوک به لیشمانیوز جلدی گسترش تهیه شده و پس از رنگ‌آمیزی با گیمسا و مشاهده میکروسکوپی اجسام لیشمن تشخیص مسجل می گردد. علی‌رغم ویژگی بسیار بالای این روش، حساسیت آن کم است. بنابراین نتایج مطالعات اپیدمیولوژیک انجام شده در ایران که بر اساس روش میکروسکوپی بوده است، نمی‌توانند نشان دهنده میزان شیوع و بروز واقعی بیماری در جامعه باشند. از آن‌جاکه حساسیت روش‌های مولکولی در تعیین آلودگی لیشمانیایی در نمونه‌های بالینی به دست آمده از بیماران مبتلا به سالک بیش‌تر از روش‌های میکروسکوپی می‌باشد برخی از محققین استفاده از این روش‌ها را به عنوان روش استاندارد طلایی برای تشخیص بیماری توصیه نموده‌اند. هر چند که روش‌های مولکولی مانند PCR هنوز محدودیت‌های خاص خود را دارند. از جمله این محدودیت‌ها می‌توان به گران قیمت بودن مواد مورد استفاده، نیاز به تجهیزات پیشرفته و گران قیمت، نیاز به متخصصین ویژه برای استفاده از این تکنیک‌ها و نیاز به کار در شرایط نسبتا استریل و بدون آلودگی اشاره نمود. مجموعه این محدودیت‌ها باعث شده که در بسیاری از مناطق اندمیک و دور افتاده جهان امکان استفاده از این روش‌ها بسیار مشکل و شاید غیر ممکن باشد(۹). شناسایی گونه‌های انگل‌های لیشمانیا در اتخاذ برنامه‌های پیشگیری و کنترل بیماری موثر است. به علت تعدد و تشابه شکلی گونه‌های انگل، رده‌بندی آن به گونه‌ها و سویه‌های متفاوت بسیار مشکل است و شواهد اپیدمیولوژیکی و بالینی نیز به تنهایی در افتراق میان گونه‌ها کارساز نمی‌باشد(۱۰) مشاهده ظهور مجدد و گسترش این بیماری در مناطق زیادی از سراسر جهان در ارتباط با سه فاکتور اصلی شامل تغییرات زیست محیطی توسط انسان، ضعف و مشکلات ایمنی و شکست درمان و مقاومت داروئی است(۱۱). امروزه به نظر می‌رسد تاکسونومی انگل بر اساس ساختار جمعیتی و تنوع ژنتیکی انگل برای درک درست این تغییرات اپیدمیولوژیکی لازم باشد(۱۲).

به همین دلیل امروزه برای تعیین گونه انگل‌های لیشمانیا بیش‌تر از روش‌هایی که براساس ساختار ژنتیکی می‌باشد، استفاده می گردد. از جمله می‌توان به روش‌های مختلف PCR اشاره نمود که به فراوانی در مطالعات مختلف مورد استفاده قرار گرفته‌اند. با استفاده از این روش‌ها مطالعات فراوانی هم برای تشخیص بیماری و هم برای تعیین گونه لیشمانیا در بیماران، ناقلین و مخازن آن در ایران و سایر نقاط جهان انجام شده است. شناسایی دقیق گونه‌های لیشمانیای عامل بیماری برای تعیین روش‌های درمان و نیز برنامه ریزی برای کنترل بیماری سالک بسیار مهم است(۱۳).

در این مطالعه بیماران مشکوک به لیشمانیوز جلدی مراجعه‌کننده به کلینیک ویژه دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه طی سال ۹۴ با دو روش مشاهده میکروسکوپی و PCR تشخیص داده شده و نمونه‌های مثبت با روش PCR-RFLP تعیین گونه شده‌اند.

مواد و روش ها

در این مطالعه توصیفی ابتدا اطلاعات کلیه بیماران مشکوک به سالک که طی سال ۹۴ به کلینیک ویژه دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه مراجعه نموده بودند، ثبت گردید. کار نمونه‌گیری از سروز حاشیه زخم‌ها

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-08]

توسط متخصص انگل‌شناسی انجام شد. زخم‌ها با استفاده از الکل ۷۰ درصد ضد عفونی شده و سپس به کمک لانست استریل نمونه‌برداری از سروز حاشیه زخم‌ها انجام شد. پس از توجیه بیماران و کسب اجازه از آنان در خصوص نیاز به بخشی از سروز زخم آن‌ها جهت تشخیص مولکولی بیماری، بخشی از سروز هر بیمار در لوله ۱/۵میلی‌لیتری حاوی اتانول خالص ریخته شد و تا زمان انجام روش PCR در فریزر ۲۰ - درجه نگهداری گردید. همچنین از سروز زخم بیماران اسمیر تهیه شد و پس از رنگ آمیزی با گیمسا با میکروسکوپ نوری برای دیدن اجسام لیشمن بررسی شدند. برای بررسی مولکولی نمونه‌های بیماران مشکوک به سالک، پس از سانتریفیوژ نمودن، مایع رویی خارج و DNA با استفاده از کیت (DNA purification kit, Qiagen) از رسوب نمونه ها جدا گردید(۱۴).

آزمایش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انگل‌های لیشمانیا بر روی DNA نمونه‌ها انجام شد و جهت مشاهده تکثیر قطعه موردنظر، محصولات PCR به‌دست آمده در کنار مارکر مولکولی الکتروفورز گردید. برای تعیین گونه انگل، محصول PCR به‌دست آمده با روش PCR-RFLP و با استفاده از آنزیم *Hae*III هضم شده و در آگاروز ۲ درصد الکتروفورز شدند. سپس طول قطعات باندهای به‌دست آمده با نمونه‌های استاندارد لیشمانیا ماژور (MRHO/IR/75/ER) و لیشمانیا تروپیکا (MHOM/IR/99/YAZ1) که قبلاً از انستیتو پاستور تهیه شده بود و DNA آن‌ها در آزمایشگاه نگهداری می‌شد، مقایسه گردیده و بر اساس آن شناسایی گونه انگل انجام شد(۱۵). برای شناسایی ژنوم gene repeat Kinetoplast DNA mini-exon با باندهای ۴۴۳ bp- ۲۲۰ از پرایمرهای F: 5'-TAT TGGTAT GCG AAA CTT CCG-3' و R: 5'-ACA GAA ACT GAT ACT TAT ATA GCG-3' و برای شناسایی ژنوم ribosomal internal transcribed spacer 1=LITSR با باندهای ۳۵۰ bp- ۳۰۰ از پرایمرهای 5'-F: CTGGATCATTTTCCGATG-3' و R: 5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3' استفاده گردید. برای تایید نهایی گونه‌های شناسایی شده پنج نمونه از محصولات PCR تعیین سکانس شدند. نتایج سیکونس‌ها با استفاده از نرم‌افزار BLAST بررسی شد (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

یافته ها

در این مطالعه کلیه بیماران مشکوک به لیشمانیوز جلدی در طی سال ۹۴ که توسط پزشکان شهر کرمانشاه به آزمایشگاه کلینیک ویژه دانشگاه ارجاع شده بودند مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه زخم ۶۵ بیماران مشکوک به لیشمانیوز جلدی مورد بررسی میکروسکوپی و مولکولی قرار گرفت که ۴۷ نفر از آن‌ها (۷۲/۳ درصد) با این دو روش مبتلا به سالک شناخته شدند. ۴۲ نفر (۶۴/۶ درصد) از بیماران مذکر و ۲۳ نفر (۳۵/۴ درصد) مونث بودند. میانگین سنی بیماران ۲۲/۰۵ ±۳۴ سال بود. تعداد ۳۲ نفر (۴۹/۲ درصد) از بیماران ساکن کرمانشاه و ۳۳ نفر (۵۰/۸ درصد) از شهرستان‌های دیگر استان بودند. تعداد ۳۱ نفر (۴۷/۷ درصد) سابقه مسافرت به استان‌های دیگر در چند ماه گذشته را ذکر کردند. تعداد ۱۸ بیمار باقیمانده گرچه به ظاهر زخمی مشابه سالک داشتند اما نتیجه آزمایش میکروسکوپی و مولکولی آن‌ها از نظر سالک منفی بود. در بررسی میکروسکوپی نمونه‌های بیماران با روش رنگ‌آمیزی گیمسا در ۳۳ نمونه (۵/۸ درصد) اجسام لیشمن مشاهده گردید. تصویر زخم‌های تعدادی از بیماران در تصویر شماره ۱ دیده می‌شود.

میانگین سابقه بیماری (ضایعه پوستی) ۱۲۳/۹±۹۶/۱۱ روز بود که در افراد دارای نتیجه مثبت ۱۳۳/۱±۹۵/۴ روز و در افراد با نتیجه منفی ۱۰۰/۳± ۹۷/۹ روز بود. نتایج بررسی مولکولی نمونه‌های بیماران نشان داد که با روش PCR نه تنها تمامی ۳۳ نمونه‌ای که با روش

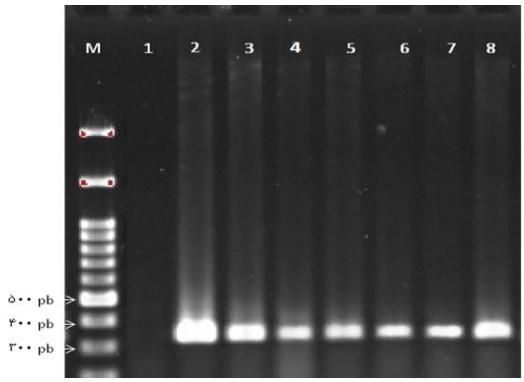
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-08]

میکروسکوپی مثبت شدند، بلکه تعداد ۱۴ نمونه از بیمارانی که با بررسی میکروسکوپی و لام رنگ‌آمیزی شده منفی شده بودند نیز مثبت شدند.



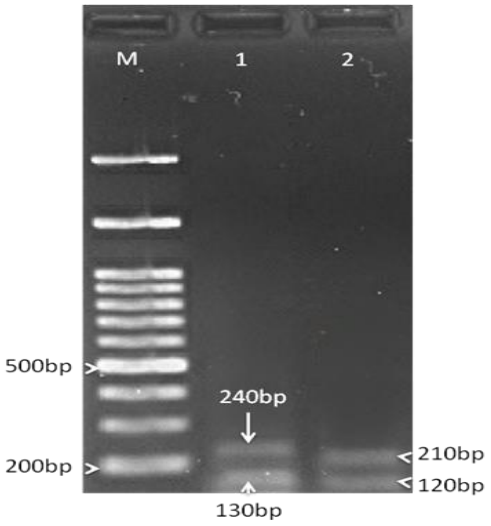
تصویر شماره ۱: سه مورد از بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی مراجعه کننده به کلینیک ویژه دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه در سال ۹۴-۹۳

بنابراین در مجموع با روش PCR تعداد ۴۷ مورد (۷۲/۳ درصد) از نظر لیشمانیا مثبت شدند. در بررسی نمونه های بیماران با روش PCR اندازه قطعه DNA تکثیر یافته بین ۳۵۰ تا ۴۰۰ جفت باز بود که با اندازه قابل انتظار بیان شده در مقالات مشابه مطابقت داشت (تصویر شماره۲).



تصویر شماره ۲: محصول به دست آمده از PCR نمونه های بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی (M مارکر DNA (۱۰۰ bp)، ۱ کنترل منفی، ۲ کنترل مثبت و موارد ۳ تا ۸ نمونه های بیماران می باشند)

بررسی‌های انجام شده با روش PCR-RFLP بر روی DNA های جدا شده نشان داد که ۷ نمونه از ۴۷ نمونه مثبت مورد بررسی، لیشمانیا تروپیکا (۱۴/۹ درصد) و ۴۰ نمونه (۸۵/۱ درصد) لیشمانیا ماژور بودند. همان‌گونه که در تصویر شماره ۳ دیده می‌شود قطعات مربوط به لیشمانیا ماژور بین حدود bp ۲۴۰-۱۳۰ و قطعات مربوط به لیشمانیا تروپیکا بین حدود bp ۲۱۰-۱۲۰ بودند (تصویر شماره ۳).



تصویر شماره۳: محصول به‌دست آمده از PCR-RFLP نمونه‌های بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی با استفاده از آنزیم *Hae*III (M= مارکر DNA (۱۰۰bp). ۱=نمونه لیشمانیا ماژور، ۲=نمونه لیشمانیا تروپیکا).

برای کسب اطمینان از نتایج تعیین گونه انجام شده توسط PCR- RFLP، تعداد ۵ نمونه از محصولات PCR از بیماران مختلف به صورت تصادفی انتخاب و تعیین سکانس شدند. سکانس‌های حاصله با استفاده از نرم‌افزار BLAST آنالیز شدند که نتایج به‌دست آمده با روش مولکولی را تایید نمودند.

بحث

در این مطالعه همه نمونه‌هایی که با روش میکروسکوپی مثبت شده بودند در روش مولکولی نیز مثبت شدند. همان‌گونه که مشاهد گردید در روش میکروسکوپی فقط ۵۰/۸ درصد از بیماران مشکوک به لیشمانیوز به عنوان بیمار مبتلا به سالک شناسایی شدند در حالی که با روش PCR در مجموع ۷۲/۳ درصد از آنان به عنوان بیمار مبتلا به سالک شناخته شدند. همه بیماران شناسایی شده تحت درمان اختصاصی قرار

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-08]

گرفتند و زخم‌های سایر بیمارانی که از نظر سالک منفی بودند، توسط پزشک متخصص پوست مسیر تشخیص و درمان خاص خود را طی نمودند.

برتری روش‌های مولکولی در شناسایی بیماران مبتلا به سالک در بسیاری از مطالعات داخلی و خارجی نشان داده شده است. پقه و همکاران در مطالعه ۳۰۳ بیمار مشکوک به لیشمانیوز پوستی مراجعه کننده به آزمایشگاه مرکز بهداشت شهرستان گنبد کاووس و به منظور ارزیابی روش PCR برای تشخیص بیماری و شناسایی گونه‌های مختلف انگل لیشمانیا، توانستند با روش آزمایش مستقیم ۷۸/۵ درصد موارد را شناسایی نمایند. آن‌ها با روش PCR بر روی ۶۵ گسترش مستقیم فاقد جسم لیشمن، توانستند در ۵۲/۳ درصد موارد، DNA کینتوپلاست انگل لیشمانیا را شناسایی نمایند. آن‌ها پیشنهاد نموده‌اند که به دلیل منفی شدن بسیاری از موارد اسمیر مستقیم و حساسیت کم این روش، در موارد کم انگل و مشکوک به سالک، برای تشخیص دقیق‌تر از روش PCR استفاده گردد(۱۶). فولادی و همکاران نیز به منظور مقایسه کارآیی روش PCR در مقایسه با روش میکروسکوپی و کشت invitro برای تشخیص مستقیم لیشمانیوز جلدی و نیز شناسایی گونه انگل، ۷۳ بیمار مشکوک به لیشمانیوز جلدی از روستاهای میرجاوه را با سه روش میکروسکوپی، PCR و کشت در محیط NNN مورد بررسی قرار دادند. آنان به ترتیب ۳۸/۴ درصد، ۵۵/۵ درصد و ۶۳/۱۵ درصد از نمونه‌ها را با روش‌های میکروسکوپی، PCR و کشت در محیط NNN مثبت گزارش نمودند(۱۷).

Kristen و همکاران نیز در کشور کلمبیا با انجام روش PCR بر روی ۲۵۵ نمونه از بیماران مبتلا به فرم حاد لیشمانیوز جلدی، حساسیتی بیش از ۷۵/۷ درصد نسبت به روش‌های معمول تشخیصی بیان نمودند. آن‌ها حساسیت روش‌های میکروسکوپی، کشت نمونه‌های بیوپسی و کشت مواد آسپیره شده از ضایعه را به ترتیب ۴۶/۷ درصد، ۵۵/۳ درصد و ۴۶/۳ درصد به دست آوردند. در بررسی ۴۴ بیمار مبتلا به فرم مزمن بیماری نیز حساسیت روش مولکولی ۴۵/۵ درصد بیش‌تر از روش‌های معمول بود. این محققین نیز انجام روش مولکولی را برای تشخیص دقیق‌تر اشکال حاد و مزمن بیماری توصیه نموده‌اند(۱۸).

Esther و همکاران نیز برای روش PCR با استفاده از DNA کینتوپلاستی انگل حساسیتی معادل ۹۸/۷ درصد و با استفاده از internal transcribed spacer 1 (ITS1) حساسیتی معادل ۹۱ درصد با استفاده از spliced leader mini-exon PCR حساسیتی معادل ۵۳/۸ درصد گزارش نموده‌اند(۱۹).

در بررسی پقه و همکاران بر روی ۳۰۳ بیمار مشکوک به لیشمانیوز جلدی مراجعه‌کننده به آزمایشگاه مرکز بهداشت گنبد کاووس، ۷۸/۵ درصدآن‌ها به روش مستقیم شناسایی شدند.آن‌ها با استفاده از روش مولکولی PCR توانستند در ۵۲/۳ درصد از بیمارانی که گسترش مستقیم آن‌ها فاقد جسم لیشمن بود، DNA کینتوپلاست انگل لیشمانیا را شناسایی نمایند و انگل‌های لیشمانیا را تعیین گونه نمایند(۱۶).

کرمیان و همکاران در مطالعه ۵۱ بیمار مشکوک به لیشمانیوز جلدی با استفاده از روش مولکولی PCR توانستند در ۷۲/۵ درصد از آن‌ها عامل لیشمانیا را شناسایی نمایند، در حالی که فقط ۵/۹ درصد از آن ها با روش میکروسکوپی مثبت شده بودند.آن‌ها هم‌چنین با استفاده از این تکنیک گونه های عامل بیماری لیشمانیوز را شناسایی نمودند(۲۰).

در مطالعات فراوانی از روش‌های مولکولی PCR برای شناسایی گونه انگل عامل بیماری سالک استفاده شده است. مهاجری و همکاران با روش RAPD-PCR، گونه لیشمانیا تروپیکا را در تمامی ۵۷ نمونه به‌دست آمده از افراد مبتلا به سالک در آزمایشگاه های مراکز بهداشت شهرستان نیشابور عامل بیماری مزبور گزارش نموده اند(۲۱). محمدی ازنی و همکاران نیز در مطالعه مشابهی با روش Nested PCR، در ۶۷ بیمار مبتلا به

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-08]

ضایعات پوستی مراجعه کننده به آزمایشگاه مرکز بهداشت شهرستان دامغان عامل بیماری را لیشمانیا ماژور گزارش نموده‌اند(۲۲). حمزوی و همکاران نیز در استان بوشهر از بیماران مبتلا به سالک سوش‌های انگل را جدا و با روش RAPD- PCR شناسائی و گونه لیشمانیا ماژور را به عنوان عامل بیماری سالک در این استان گزارش نمودند(۵).

پقه و همکاران در مطالعه دیگری در شهرستان تربت جام با روش مولکولی PCR گونه لیشمانیا تروپیکا را به عنوان عامل بیماری شناسایی نمودند(۲۳). واعظ‌نیا و همکاران در مشهد با روش PCR-RFLP توانستند در ۵۰ نمونه از بیماران مورد بررسی، در ۳۴ درصد آنان لیشمانیا ماژور و در ۶۶ درصد بقیه لیشمانیا تروپیکا را به عنوان عوامل لیشمانیوز جلدی شناسایی نمایند(۲۴). سقفی‌پور و همکاران در بخش مرکزی قم در ۱۵ نمونه انسانی و یک نمونه جونده با روش PCR-RFLP توانستند گونه لیشمانیا ماژور به عنوان عامل بیماری لیشمانیوز جلدی روستایی در این مناطق شناسایی نمایند(۲۵) و بالاخره بهشتی و همکاران در ۳۵ نمونه لیشمانیای به دست آمده از نواحی مختلف کشور با استفاده از روش PCR-RFLP توانستند در ۹۴ درصد موارد، لیشمانیا ماژور و در ۶ درصد بقیه لشیمانیا تروپیکا را شناسایی نمایند(۲۶).

در مطالعه حاضر ۵ نمونه از محصولات PCR به دست آمده از بیماران تعیین سکانس شدند که با استفاده از نرم‌افزار BLAST آنالیز شدند. سکانس‌های به دست آمده در این ۵ نمونه، نتایج به‌دست آمده با روش مولکولی را تایید نمود. هم‌چنین در این مطالعه توالی ژنی به‌دست آمده برای *Leishmania tropica* با سکانس یک ایزوله شیراز و یک ایزوله خراسان ۹۳ درصد مشابهت داشت. توالی ژنی به دست آمده برای *Leishmania major* نیز با ۳ ایزوله دهلران ۱۰۰ درصد مشابه بود(۲۹-۲۷). تشابه صد درصدی برخی ایزوله‌های لیشمانیا ماژور با ایزوله‌های دهلران حاکی از یکسان بودن این ایزوله‌ها می‌باشد که با توجه به سوابق مسافرت بیماران به مناطق دیگر کشور قابل توجیه است. هم‌چنین تشابه ۹۳ درصدی برخی ایزوله‌های لیشمانیا تروپیکا با ایزوله‌های شیراز و خراسان نشان می‌دهد که این ایزوله‌ها ممکن است تفاوت اندکی با هم داشته باشند و سکانس ایزوله‌های مزبور قابل ثبت در بانک ژنی می‌باشد.

همان‌طورکه ملاحظه گردید در مطالعه ما و بسیاری از مطالعات مورد بحث میزان حساسیت و ویژگی روش مولکولی به‌طور قابل توجهی بیش‌تر از روش میکروسکوپی بود. به هر حال محدودیت‌های موجود در به کارگیری روش‌های مولکولی به عنوان روش انتخابی و استاندارد برای تشخیص بیماران مشکوک به لیشمانیوز مانع از توسعه کاربردی این روش‌ها در بسیاری از آزمایشگاه‌های تشخیصی در ایران می‌باشد. به نظر می‌رسد استفاده از دقت روش‌های مولکولی در شناسایی گونه انگل‌های لیشمانیا، در آینده با ابداع روش‌های آسان‌تری برای شناسایی قطعات ژنوم اختصاصی جنس لیشمانیا در آزمایشگاه‌ها، بتوان با سرعت بیش‌تر و حساسیت و ویژگی بالاتر بیماران مبتلا به لیشمانیوز را شناسایی نمود.

سپاسگزاری

نویسندگان لازم می‌دانند از حوزه معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه و شورای محترم پژوهشی دانشکده پزشکی که حمایت و بودجه لازم برای انجام این تحقیق را فراهم نمودند تشکر و قدردانی نمایند.

References

1. WHO. Cutaneous leishmaniasis. Weekly Epidemiol Rec 2002; 77(29): 246.
2. WHO. Control of the leishmaniasis, report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. Geneva: WHO. 1990.
3. Ardehali S, Rzaii R, Nadim A. The leishmania parasites and Leishmaniasis. 1th ed.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-08]

Tehran: Tehran university press; 1994 (Persian).

4. Hajjaran H, Mohebali M, Razavi MR, Rezaei S, Kazemi B, Edrissian Gh H, et al. Identification of Leishmania Species Isolated from Human Cutaneous Leishmaniasis, using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR). Iranian J Pub Health 2004; 33(4): 8-15.
5. Hamzavi Y, Mohebali M, Edrissian GH H, Foruzani A R. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis (human infection and animal reservoirs) in Dashti and Dashtestan districts, Bushehr province. Iranian J Public Health 2000; 29(1-4): 177-190 (Persian).
6. Hamzavi Y, Edrissian Gh H, Mohebali M, Foruzani AR. Frequency of cutaneous leishmaniasis in Bushehr province, 1983-1999. Kermanshah Uni Med Sci J 2001; 5(3): 1-8 (Persian).
7. Nazari N, Faraji R, Vejdani M, Mekaeili A, Hamzavi Y. The Prevalence of Cutaneous Leishmaniases in Patients Referred to Kermanshah Hygienic Centers. ZJRMS 2012; 14(8): 77-79.
8. Hamzavi Y. Epidemiological study of cutaneous leishmaniasis (CL) in different districts of Kermanshah province, Iran. Iranian J Parasitolo 2010; 5(Supp1): 51 (Persian).
9. Reithinger R & Dujardin J. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. J Clin Microbiol 2007; 45(1): 21-25.
10. Alvar J, Barker JR. Molecular tools for epidemiological studies and diagnosis of leishmaniasis and selected other parasitic diseases. Trans R Soc Trop Med Hyg 2002; 96(Suppl 1): S1-S250.
11. Dujardin JC. Risk factors in the spread of Leishmaniases: Towards integerated monitoring. Trend Parasitol 2006; 22(1): 4-6.
12. Banuls AL, Hide M, Tibayrence M. Molecular epidemiology and evolutionary genetics of Leishmania Parasites. Int J Parasitol 1999; 29(8): 1137-1147.
13. Ghasemloo H, Rasti S, Delavari M, Doroodgar A. Molecular Diagnosis of Clinical Isolates of Cutaneous Leishmaniasis Using ITS1 and KDNA Genes and Genetic Polymorphism of Leishmania in Kashan, Iran Pak J Biol Sci 2016; 19(3): 136-142.
14. Evans D. Hand book on isolation, characterization and cryopreservation of Leishmania. Geneva: WHO; 1989.
15. Marfurt J, Niederwieser I, Makia ND, Beck HP, Felger I. Diagnostic genotyping of Old and New World Leishmania species by PCR-RFLP. Diagn Microbiol Infect Dis 2003; 46(2): 115-124.
16. Pagheh A,Fakhar M,Mesgarian F,Gholami S,Badiei F. Detection and identification of cutaneous leishmaniasis by PCR method. J Mazandaran Univ Med Sci 2011; 21(1): 85-92.
17. Fouladi B, Sharifi I, Ebrahim zadeh A, Hashemi shahri SM, Morad gholi HR, Sarabandi no A, et al. Evaluation of a direct PCR in comparison with routine microscopy and In vitro culture for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. J Tabib Shargh 2007; 9(3): 181-189 (Persian).
18. Weigle KA, Labrada LA, Lozano C, Santrich C, Barker DC. PCR-Based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania (Viannia). J Clin Microbiol 2002; 40(2): 601-606.
19. Esther B, Abedelmajeed N, Flory J, Lionel FS, Charles LJ. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. J Clin Microbiol 2006; 44(4): 1435-1439.
20. Karamian M, Motazedian MH, Fakhar M, Pakshir K, Jowkar F, Rezanezhad H.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-08]

Atypical presentation of Old-World cutaneous leishmaniasis, diagnosis and species identification by PCR. J Eur Acad Dermatol Venereol 2008; 22(8): 958-9562.

21. Mohajeri M, Hajaran H, Shamsian s AA, Tavakol Afshari J, Saad abadi F. Identification of Leishmania Species Causing Cutaneous Leishmaniasis by RAPD-PCR in neyshabur. Medical J Mashhad Univ Med Sci 2008; 51(2): 79-130 (Persian).
22. Mohammadi Azni S, Rassi Y, Oshaghi MA, Yaghoobi Ershdi MR, Mohebali M, Abai MR, et al. Determination of parasite species of cutaneous leishmaniasis using Nested PCR in Damghan-Iran, during 2008. J Gorgan Univ Med Sci 2010; 13(1): 59-65 (Persian).
23. Pagheh AS, Fakhar M, Mesgarian F, Gholami S, Badiee F. Detection and Identification of Causative agent of Cutaneous Leishmaniasis Using Specific PCR. J Mazandaran Univ Med Sci 2012; 22(Supple 1): 85-92 (Persian).
24. Vaeznia H, Dalimi A, Sadraei J, Pirstani M. Determination of Leishmania species causing Cutaneous leishmaniasis in Mashhad by PCR-RFLP method. Arch Razi Institute 2009; 64(1): 39-44.
25. Saghafipour A, Rassi Y, Abai MR, Oshaghi MA, Yaghoobi Arshadi MR, Mohebali M, et al. Identification of Leishmania species in patients and reservoir rodents using PCR–RFLP in the central county of Qom province in 2010. Arak Medical University Journal 2012; 15(6): 1-10 (Persian).
26. Beheshti N, Ghafarifar F, Dalimiasl A, Eslamirad Z, Sharifi Z, Farivar Sadri M,et al. Detection of Cutaneous Leishmanioasis Isolated From Iranian Patients By Using ITS1 Gene and Apol Enzyme via PCR-RFLP Molecular Method. SJIMU 2013; 20(4): 71-78 (Persian).
27. Darabi S, Khaze V, Riazi-Rad F, Darabi H, Bahrami F, Ajdary S, et al. Leishmania major strains isolated from distinct endemic areas show diverse cytokine mRNA expression levels in C57BL/6 mice: Toward selecting an ideal strain for the vaccine studies. Cytokine 2015; 76(2): 303-308.
28. Oshaghi MA, Rasolian M, Shirzadi MR, Mohtarami F, Doosti S. First report on isolation of Leishmania tropica from sandflies of a classical urban Cutaneous leishmaniasis focus in southern Iran. Exp Parasitolo 2010; 126(4): 445-450.
29. Karamian M, Kuhls K, Hemmati M, Ghatee MA. Phylogenetic structure of Leishmania tropica in the new endemic focus Birjand in East Iran in comparison to other Iranian endemic regions. Acta Trop 2016; 158: 68-76.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-08]