فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال ششم، شماره 22، تابستان 1396، صفحه 101- 112
تاریخ دریافت: 1395/08/18 – تاریخ پذیرش:
1395/10/13

بررسی کاربرد اینترفرون گاما برای تشخیص بیماران مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر

محمد معافی: دانشجوی دکترای تخصصی ایمنی‌شناسی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان، ایران، mohammoafi@yahoo.com
حسین رضوان *: دکترای تخصصی ایمنوپارازیتولوژی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان، ایران، hosseinrezvanbas@gmail.com
رویا شرکت: دانشیار بیماری‌های عفونی و گرمسیری، مرکز تحقیقات نقص ایمنی اکتسابی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران، sherkat@med.mui.ac.ir
سید حمید زرکش اصفهانی: دانشیار ایمونولوژی، دانشگاه اصفهان، ایران، s.h.zarkesh@sheffield.ac.uk
رویا طالبان: متخصص پزشکی اجتماعی، مرکز تحقیقات نقص ایمنی اکتسابی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران، royataleban@yahoo.com
علی اصیلیان: استاد بیماری‌های پوست و مو، مرکز تحقیقات بیماری‌های پوست و سالک، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران، asilian@med.mui.ac.ir
محمدعلی نیلفروش‌زاده: استاد بیماری‌های پوست و مو، مرکزتحقیقات پوست و سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران، nilfroushzadeh@mui.ac.ir
فریبا جعفری: استاد فارماکولوژی، مرکز تحقیقات بیماری‌های پوست و سالک، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران، Jaffary@pharm.mui.ac.ir
مرجان منصوریان: دانشیارآمار زیستی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران، jmansourian@gmail.com
فاطمه سخنوری: پزشک عمومی، مرکز تحقیقات بیماری‌های پوست و سالک، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران، dr_f_sokhanvari@yahoo.com
نازلی انصاری: پزشک عمومی، مرکز تحقیقات بیماری‌های پوست و سالک، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران، nazli_md@hotmail.com

چکیده

مقدمه: مطالعات انجام‌شده روی الگوهای حیوانی نشان می‌دهند که کمبود اینترفرون گاما باعث اختلال در روند التیام عفونت *لیشمانیا* می‌شود. به نظر می‌رسد که سطح تولید اینترفرون گاما می‌تواند در مدت زمان التیام زخم *لیشمانیا* در انسان نیز مؤثر باشد. هدف این مطالعه، بررسی امکان استفاده از اینترفرون گاما برای تشخیص بیماران مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر است.

مواد و روش‌ها: سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی 32 بیمار مبتلا به لیشمانیوز التیام‌ناپذیر یا التیام‌پذیر جدا و میزان تولید اینترفرون گامای آنها با روش الایزا اندازه‌گیری شد. سپس نقطه برش (Cut-Off Point) تولید اینترفرون برای تعیین بیماران مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر با استفاده از آنالیز منحنی راک (ROC-Curve) محاسبه شد. همچنین برای هریک از بیماران، آزمون جلدی لیشمانین انجام شد.

نتایج: سطح اینترفرون گامایی که سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی تحریک‌شده با آنتی‌ژن محلول *لیشمانیا* و یا میتوژن فیتوهماگلوتینین تولید می‌کنند در گروه بیماران مبتلا به سالک التیام‌پذیر به‌شکل معناداری از بیماران مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر بیشتر بود ($p<0/001$). نقطه برش (Cut-Off Point) اینترفرون گاما در مناسب‌ترین حساسیت (87/5 درصد) و ویژگی (100 درصد) برابر 1208 پیکوگرم در میلی‌لیتر بود. همچنین سطح اندوراسیون حاصل از آزمون جلدی لیشمانین در بیماران مبتلا به سالک التیام‌پذیر به‌شکل معناداری از افراد مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر بیشتر بود ($p=0/023$).

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

www.SID.ir

بحث و نتیجه‌گیری: کمبود تولید اینترفرون گاما می‌تواند یکی از عوامل لیشمانیوز التیام‌ناپذیر در انسان باشد؛ در واقع، از کمبود اینترفرون گاما می‌توان برخی از بیماران مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر را شناسایی کرد.

واژه‌های کلیدی: لیشمانیوز جلدی، اینترفرون گاما، لیشمانین

مقدمه

لیشمانیوز، بیماری تک‌یاخته‌ای منتقل‌شونده از طریق پشه خاکی ماده است که پس از بیماری مالاریا بیشترین شیوع را در جهان دارد (1). ایران یکی از شایع‌ترین کانون‌های بیماری لیشمانیوز جلدی است و میزان بروز این بیماری در سال 1392، 22 نفر در هر 100 هزار نفر گزارش شده است. استان‌های ایلام، فارس، خراسان رضوی و اصفهان به‌ترتیب بیشترین موارد جدید این بیماری را در ایران دارند. تک‌یاخته *لیشمانیا ماژور*[1] بیشتر موارد این بیماری را در ایران ایجاد می‌کند و *لیشمانیا تروپیکا*[2] تنها حدود 33/4 درصد موارد جدید سالک را ایجاد می‌کند (2). دوره کمون بیماری سالک شهری حاصل از *لیشمانیا تروپیکا* 2 تا 8 ماه و دوره کمون سالک روستایی ایجادشده در اثر *لیشمانیا ماژور* کمتر از 4 ماه است (3 و 4).

تشخیص بیماری لیشمانیوز براساس تظاهرات بالینی، شواهد هیستوپاتولوژیک زخم *لیشمانیا*، جدا و مشاهده انگل موجود در زخم و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[3] انجام می‌شود. تشخیص *لیشمانیا* با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و ریل‌تایم پی‌سی‌آر[4] نسبت به سایر روش‌ها حساسیت[5] و ویژگی[6] قبول‌پذیری دارد و بر نواحی مختلفی مانند ژن *اینترنال ترانسکرایب اسپیسر*[7]، توالی‌های *اسیدزوکسی ریبونوکلئیک کینتوپلاست*[8]، ژن *پروتئین شوک حرارتی هفتاد*[9] و ژن *تریپاردوکسین پراکسیداز*[10] انجام می‌شود (1، 5-8).

امروزه از آلوپورینول[11] و داروهای آنتی‌موان پنج‌ظرفیتی[12] مانند گلوکانتیم[13] و پنتوستام[14] برای درمان بیماران مبتلا به لیشمانیوز استفاده می‌شود. این داروها ممکن است عوارض جانبی شدیدی مانند آسیب شدید کلیوی در فرد ایجاد کنند؛ همچنین این درمان‌ها در برخی بیماران به‌ویژه بیماران مبتلا به لیشمانیوز مزمن کارایی کمی دارند (9 و 10).

به‌طور معمول، ضایعات ناشی از لیشمانیوز جلدی یا سالک در مدت زمان کمتر از دو سال و خودبه‌خود بهبود می‌یابند؛ هرچند گاهی زخم فعال حاصل از سالک می‌تواند برای سال‌های طولانی باقی بماند (3). براساس مطالعات فراوان انجام‌شده روی الگوهای حیوانی، مشخص شده است که پیش‌آگهی عفونت‌های ایجادشده از انگل‌های جنس *لیشمانیا* وابسته به فعال‌شدن یکی از دو زیرگروه لنفوسیت‌های TH1[15] و یا TH2[16] است؛ برای مثال، عفونت حاصل از تک‌یاخته *لیشمانیا* در موش‌های نژاد C57BL/6 به ایجاد پاسخ‌های TH1 و اینترفرون گامای[17] حاصل از آن منجر می‌شود. تزریق انگل *لیشمانیا* در این نژاد می‌تواند ضایعات مختصر پوستی مانند سالک را ایجادکرده و ایمنی مؤثری در برابر تک‌یاخته *لیشمانیا* ایجاد کند. در مقابل، تزریق انگل *لیشمانیا* به موش‌های نژاد BALB/c به برانگیخته‌شدن پاسخ‌های TH2 و مرگ 100 درصدی

www.SID.ir

موش‌های آلوده منجر می‌شود (11).

درباره ارتباط اینترفرون گاما با طول دوره بیماری سالک در انسان مطالعات محدودی انجام شده و نتایج آنها متفاوت و گاهی متناقض است. برای مثال، برخی از یافته‌ها تولید مقادیر کمی از اینترفرون گاما در بیماران مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر را نشان داده و برخی دیگر از مطالعات بر تولید مقادیر فراوانی از اینترفرون گاما در بیماران مبتلا به سالک مزمن دلالت می‌کنند (12-15). هدف از انجام مطالعه حاضر، تبیین دقیق ارتباط بیماری سالک التیام‌ناپذیر با اینترفرون گاما وتعیین نقطه برش[18] مناسب برای شناسایی بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی التیام‌ناپذیر است.

مواد و روش‌ها

طراحی مطالعه، ملاحظات اخلاقی و نمونه‌گیری: برای برآورد حجم نمونه، تمام افراد در دسترسی که بیماری نادر مدنظر را داشتند در مطالعه شرکت داده شدند و برای افزایش قدرت مطالعه، به ازای هر بیمار مبتلا به بیماری نادر لیشمانیوز التیام‌ناپذیر، 3 نفر بیمار شاهد (دارای زخم فعال سالک التیام‌پذیر) در نظر گرفته شد (16). براین اساس، در مجموع 32 بیمار شامل 24 بیمار مبتلا به سالک التیام‌پذیر و 8 بیمار مبتلا به زخم سالک التیام‌ناپذیر بررسی شدند. افراد مبتلا به سالک التیام‌پذیر، زخم فعال سالک را داشتند و زخم آنها در مدت کمتر از یک سال بهبود یافته بود؛ این افراد مدت 9 ماه پس از بهبودی برای تأیید ایجادنشدن زخم مشکوک به سالک در آنها پیگیری[19] شدند (17). در گروه بیماران مبتلا به لیشمانیوز التیام‌ناپذیر، پرونده پزشکی بیماران بررسی شد و اگر بیش از 2 سال به زخم فعال و مزمن سالک مبتلا بودند در گروه بیماران سالک التیام‌ناپذیر طبقه‌بندی شدند (3). این پروژه در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی همدان بررسی و تأیید شد. پس از دریافت رضایت‌نامه کتبی از داوطلبانی که مایل به شرکت در مطالعه بودند، نمونه‌گیری از زخم با تیغ بیستوری و در شرایط استریل انجام و بیماری سالک در تمام بیماران با روش لام مستقیم (رنگ‌آمیزی گیمسا) یا کشت انگل در محیط دوفازی N.N.N[20] تأیید شد. سپس 20 میلی‌لیتر خون محیطی هپارینه از هر بیمار مبتلا به سالک گرفته شد و سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی[21] روی فایکول[22] جدا شدند. همچنین، طی این مطالعه اطلاعات دموگرافیک شامل سن و جنس و سوابق بالینی مرتبط با سالک برای هریک از بیماران ثبت شد.

آزمون پوستی لیشمانین[23]: برای انجام آزمون پوستی لیشمانین از ویال های تست و شاهد تولیدی مؤسسه پاستور ایران استفاده شد. هریک از ویال‌های تست شامل 6×10^6 عدد پروماستیگوت‌های کشته‌شده *لیشمانیا ماژور* بودند که در محلول تیومرسال 0/01 درصد موجود در بافر فسفات‌سالین[24] قرار داشتند. ترکیب ویال‌های شاهد دقیقاً مانند ویال‌های تست بود ولی آنتی‌ژن *لیشمانیا* را نداشت. آزمون پوستی لیشمانین با تزریق 0/1 میلی‌لیتر سوسپانسیون دارای آنتی‌ژن در ناحیه ولار[25] ساعد دست راست انجام شد؛ عمل تزریق با سوزن گیج 27 و داخل پوستی[26] انجام شد. همچنین 0/1 میلی‌لیتر از محلول ویال‌های شاهد در ناحیه پشتی[27] ساعد دست راست تزریق شد. پس از 48 ساعت تورم حاصل از تزریق با کولیس اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از آزمون پوستی لیشمانین در یکی از سه گروه منفی (تورم صفر تا 5 میلی‌متر)، مثبت (تورم 6 تا 14 میلی‌متر)، و مثبت قوی[28] (بیش از 15 میلی‌متر) طبقه‌بندی شدند (18).

تهیه آنتی‌ژن محلول *لیشمانیا*[29]: برای تهیه آنتی‌ژن *لیشمانیا*، از سویه استاندارد *لیشمانیا ماژور* استفاده شد

www.SID.ir

(MRHO/IR/75/ER). سویه یادشده در محیط RPMI 1640 غنی‌شده با سرم جنین گوساله 10[30] درصد و حاوی 100 واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر[31] پنی‌سیلین و 100 میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین در دمای 26 درجه سانتی‌گراد کشت شد. سپس پروماستیگوت‌های فاز ایستا برداشت و چهار بار در محلول بافر فسفات‌سالین[21] استریل (pH=7.2) شستشو شدند. سلول‌های یادشده (1×10^9سلول در میلی‌لیتر) در محلول بافر لیزکننده حاوی 100میلی‌مولار ترکیب تریس کلریدریک‌اسید[32]، 1میلی‌مولار اتیلن‌دی‌آمین‌تترااستیک‌اسید[33] غنی‌شده با لئوپپتین[34] (به غلظت 50 میکروگرم در میلی‌لیتر) و 1/6میلی‌مولار از فنیل‌متیل‌سولفونیل‌فلورید[35] قرار گرفتند (تمام مواد محلول بافر لیزکننده از کمپانی سیگما[36] تهیه شدند). برای جلوگیری از واسرشت‌شدن پروتئین انگل، 50 میکرولیتر در میلی‌لیتر از آنزیم مهارکننده کوکتل‌پروتئاز[37] ساخت شرکت سیگما به سوسپانسیون فوق اضافه شد. محلول حاوی پروماستیگوت هفت‌مرتبه در دماهای منفی70 و مثبت 37 درجه سانتی‌گراد منجمد و ذوب شد و سپس عمل سونیکه‌شدن انگل هفت‌مرتبه (هر بار 20 ثانیه با قدرت 60 درصد) انجام شد. سوسپانسیون حاصل از انگل، دو بار در 30000g به مدت 25 دقیقه و در 100000g به مدت 4 ساعت و در دمای4 درجه سانتی‌گراد در دستگاه اولتراسانتریفیوژ (مدل ال 90 کی، ساخت کمپانی بکمن کولتر-آمریکا[38]) مستقر در دانشکده دارو دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، سانتریفیوژ شد. پس از حذف لایه لیپیدی، سوپرناتانت برداشته و فیلتر شد و غلظت پروتئین آنتی‌ژن محلول *لیشمانیا*[27] با روش بردفورد[39] اندازه‌گیری شد. آنتی‌ژن پروتئینی تهیه‌شده تا زمان مصرف در دمای منفی 70 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

کشت سلول‌های تک‌هسته‌ای و سنجش اینترفرون گاما در سوپ سلولی: سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی بیماران در پلیت‌های 12خانه‌ای مسطح حاوی RPMI 1640 غنی‌شده با سرم جنین گوساله 15 درصد و دارای 100 واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و 100 میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و 5 درصد دی‌اکسیدکربن کشت داده شدند. سلول‌های تک‌هسته‌ای هر بیمار در سه‌چاهک با غلظت 10×10^5 سلول در میلی‌لیتر در هر چاهک توزیع شدند. کل حجم محیط کشت در هر چاهک برابر 1000 میکرولیتر بود و سلول‌های موجود در هریک از چاهک‌ها با یکی از آنتی‌ژن های ✌آنتی‌ژن محلول *لیشمانیا*✍، ✌PPD[40]✍ یا ✌فیتوهماگلوتینین[41]✍ تحریک شدند. آنتی‌ژن ✌PPD✍ ازمؤسسه واکسن وسرم رازی تهیه و با غلظت 12 میکروگرم در میلی‌لیتر استفاده شد. غلظت آنتی‌ژن‌های ✌آنتی‌ژن محلول *لیشمانیا*✍، و ✌فیتوهماگلوتینین✍ (تولیدی شرکت گیبکو، انگلستان) در محیط کشت چاهک به ترتیب برابر 50 و 40 میکروگرم در میلی‌لیتر بود. 72 ساعت پس از انکوباسیون، سوپ سلولی حاصل از کشت سلولی برداشت و در دمای منفی 20 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس سنجش مقادیر اینترفرون گاما در سوپ سلولی با روش ساندویچ الایزا و کیت تجاری تشخیص اینترفرون گامای انسانی(شرکت ایبیو سیانس[42] آمریکا، شماره کاتالوگ: 88-7316-22) انجام شد. تمام مراحل الایزا براساس شیوه‌نامه کیت انجام و میزان جذب نوری نمونه‌ها در دستگاه الایزا ریدر[43] (کمپانی آوارنس[44]، ایالات متحده آمریکا) و در طول موج 450 نانومتر اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری: تمام اطلاعات دموگرافیک[45] و بالینی بیماران و همچنین نتایج حاصل از الایزا با نرم‌افزار

www.SID.ir

SPSS[46] (نسخه 20) تجزیه و تحلیل آماری شدند. سطوح اینترفرون گامای تولیدشده در هریک از گروه‌ها به کمک آزمون آنالیز واریانس با اندازه‌های تکراری[47] مقایسه شدند. برای مقایسه متغیرهای اسمی از آزمون‌های آماری کای اسکوئر پیرسون[48] وآزمون دقیق فیشر[49] استفاده شد. همچنین، متغیرهای رتبه‌ای و کمی پیوسته با مان–ویتنی[50] و تی‌تست[51] مقایسه شدند. در این مطالعه ، مقادیر p کمتر از 0/05 اختلاف آماری معنادار در نظر گرفته شد. با استفاده از منحنی راک[52] و بر مبنای مناسب‌ترین ویژگی و حساسیت، بهترین نقطه برش برای پیشگویی سالک التیام‌ناپذیرو لیشمانیوز جلدی التیام‌پذیر محاسبه شد.

نتایج

روش لام مستقیم (رنگ‌آمیزی باگیمسا)، زخم سالک همه 24 بیمار مبتلا به سالک التیام‌پذیر را تأیید کرد. در 7 نفر از 8 بیمار مبتلا به زخم سالک التیام‌ناپذیر، بیماری سالک با روش لام مستقیم و در 1 نفر، وجود انگل با روش کشت در محیط N.N.N تأیید شد. تمام بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی التیام‌پذیر یا التیام‌ناپذیر هنگام نمونه‌گیری، زخم تیپیک سالک را داشتند و بیماری سالک در تمام بیماران التیام‌ناپذیر در ابتدای تظاهر زخم سالک و قبل از ورود به فاز مزمن تأیید شده بود. میانگین سن شرکت‌کنندگان در گروه سالک التیام‌ناپذیر و سالک التیام‌پذیر به‌ترتیب برابر 21/9±38/37 و 11/45±33/58 سال بود و اختلاف آماری معناداری بین دو گروه شرکت‌کننده از نظر میانگین سنی افرادمشاهده نشد (p=0/569). میانه طول دوره زخم در گروه سالک التیام‌ناپذیر و لیشمانیوز التیام‌پذیر به‌ترتیب برابر 925 روز و 60 روز بود و هیچ‌یک از افراد شرکت‌کننده در مطالعه به فشار خون زیاد یا بیماری دیابت مبتلا نبودند. مقایسه نتایج حاصل از آزمون لیشمانین بیانگر اختلاف آماری معنادار بین دو گروه بود (p=0/023). در گروه سالک التیام‌ناپذیر، نتایج حاصل از تست لیشمانین نیمی از بیماران مثبت و سایر شرکت‌کنندگان منفی بودند. در گروه سالک التیام‌پذیر، 91/7 درصد و 8/3 درصد بیماران به‌ترتیب در گروه مثبت قوی و مثبت قرار گرفتند (جدول 1).

میانگین تولید اینترفرون گاما در چاهک‌هایی که با آنتی‌ژن‌های ✌آنتی‌ژن محلول *لیشمانیا*✍، ✌PPD✍ یا ✌فیتوهماگلوتینین✍ تحریک‌شده بودند بین دو گروه التیام‌پذیر و التیام‌ناپذیر مقایسه شد (جدول 2). میانگین سطح اینترفرون گاما در چاهک‌های حاوی ✌PPD✍ در بیماران مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر و التیام‌پذیر به‌ترتیب برابر با 20/54±27/31 و 29/57 ±45/84 پیکوگرم در میلی‌لیتر بود. نتایج نشان داد دو گروه در میزان اینترفرون گامای چاهک‌های تحریک‌شده با ✌PPD✍ اختلاف آماری معناداری ندارند (p=0/113). میانگین سطح اینترفرون گاما در چاهک‌های تحریک‌شده با ✌آنتی‌ژن محلول *لیشمانیا*✍ در بیماران مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر و التیام‌پذیر به‌ترتیب برابر با 529/86±396/74 و 1921/47±5344/85 پیکوگرم در میلی‌لیتر بود. همچنین، میانگین تولید اینترفرون گاما در چاهک‌های تحریک‌شده با

www.SID.ir

✌فیتوهماگلوتینین✍ در بیماران مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر و التیام‌پذیر به‌ترتیب برابر با 1776/18±1500/84 و 10272/60±3017/58 پیکوگرم در میلی‌لیتر بود. در این مطالعه، بین دو گروه مبتلا به سالک در سطح اینترفرون گامای چاهک‌های تحریک‌شده با ✌آنتی‌ژن محلول *لیشمانیا*✍ و میتوژن ✌فیتوهماگلوتینین✍ اختلاف آماری معناداری وجود داشت (مقادیر p برای چاهک‌های تحریک‌شده با ✌آنتی‌ژن محلول *لیشمانیا* و میتوژن ✌فیتوهماگلوتینین✍ کمتر از 0/001 بود).

جدول 1- مقایسه ویژگی‌های بالینی بیماران مبتلا به سالک بین دو گروه بیماران مبتلا به سالک التیام‌پذیر و التیام‌ناپذیر

ویژگی	بیماران مبتلا به سالک التیام‌پذیر	بیماران مبتلا به سالک غیر قابل التیام	*p*-Value
سن (سال): (میانگن±انحراف معیار)	33/58±11/45	37/38±21/90	0/0569 [λ]
جنس: تعداد شرکت‌کنندگان مرد (درصد)	23 (95/8٪)	7(87/6٪)	0/444 [η]
ملیت تعداد افراد ایرانی (درصد) تعداد افراد افغانی (درصد)	24(100٪) 0(0٪)	6(75٪) 2(25٪)	0/056 [η]
نمایه توده بدنی یا BMI[53] تعداد افراد با BMI کمتر از 5/ 18(درصد) تعداد افراد با BMI از 18/5تا 24/5 (درصد) تعداد افراد با BMI از25 تا 29/9 (درصد) تعداد افراد با BMI بیشتر از 30 (درصد)	1(4/3٪) 14(58/3٪) 7(27/9٪) 2(8/3٪)	0(0/0٪) 3(37/5٪) 3(37/5٪) 2(25٪)	0/204 [ρ]
شغل تعداد افراد کشاورز(درصد) تعداد افراد راننده (درصد) تعداد افراد در شغل‌های دیگر (درصد)	5(20/8٪) 5(20/8٪) 14(75٪)	1(12/5٪) 1(12/5٪) 6(58/3٪)	0/701 [φ]
تعداد افراد معتاد به مصرف سیگار (درصد)	3 (12/5٪)	3(37/5٪)	0/148 [η]
منطقه سکونت تعداد افراد ساکن در منطقه آندمیک برای بیماری لیشمانیوز (درصد) تعداد افراد ساکن در منطقه غیرآندمیک برای لیشمانیوز (درصد)	7(29/2٪) 17(70/6٪)	2(25٪) 6(75٪)	0/99 [η]
روش درمان تعداد افراد با تزریق موضعی گلوکانتیم (درصد) تعداد افراد با تزریق سیستمیک گلوکانتیم (درصد) تعداد افراد با درمان سنتی (درصد)	16(66/7٪) 8(33/3٪) 0(0٪)	3(37/5٪) 4(50٪) 1(12/5٪)	0/116 [φ]
محل ضایعه تعداد افراد با ضایعه سالک در صورت (درصد) تعداد افراد با ضایعه سالک در دست و یا پا (درصد) تعداد افراد با ضایعه سالک در نقاط مختلف بدن (درصد)	2(8/3٪) 19(79/2٪) 3(12/5٪)	2(25٪) 5(62/5٪) 1(12/5٪)	0/459 [φ]
زمان آغاز زخم سالک در فصل: تعداد افراد با زمان آغاز زخم سالک در بهار (درصد) تعداد افراد با زمان آغاز زخم سالک در تابستان (درصد) تعداد افراد با زمان آغاز زخم سالک در پاییز (درصد) تعداد افراد با زمان آغاز زخم سالک در زمستان (درصد)	0(0٪) 0(0٪) 6(٪25) 15(62/5٪) 3(12/5٪)	0(0٪) 0(0٪) 3(37/5٪) 5(62/5٪) 0(0٪)	0/513 [φ]

www.SID.ir

تعداد زخم سالک در هر بیمار	13(54/2٪)	4(50٪)	0/915 ρ
تعداد افراد با یک زخم سالک (درصد)	11(45/8٪)	4(50٪)	
تعداد افراد با دو زخم سالک و یا بیشتر (درصد)			
مساحت کل زخم (میلی متر): (میانگن±انحراف معیار)	23/12±19/08	39/37±17/50	0/042 λ
آزمون جلدی لیشمانین			
تعداد افراد با اندوراسیون کمتر از 5 میلی‌متر (درصد)	0(0٪)	4(50٪)	0/023 ρ
تعداد افراد با اندوراسیون 6 تا 14 میلی‌متر (درصد)	22(91/7٪)	4(50٪)	
تعداد افراد با اندوراسیون بیشتر از 15 میلی‌متر (درصد)	2(8/3٪)	0(0٪)	

توضیحات زیر نویس جدول 1

λ: روش آماری استفاده‌شده در تی‌تست

η: روش آماری استفاده‌شده در آزمون دقیق فیشر

ϑ: روش آماری استفاده‌شده کای اسکوئر پیرسون

ρ: روش آماری استفاده‌شده مان ویتنی

جدول 2- مقایسه تولید اینترفرون گامای حاصل از کشت سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در مجاورت سه آنتی‌ژن مختلف PPD، آنتی‌ژن محلول *لیشمانیا* و فیتوهماگلوتینین

سایتوکاین / گروه	غلظت اینترفرون گاما در چاهک‌های دارای آنتی‌ژن *PPD	غلظت اینترفرون گاما در چاهک‌های دارای آنتی‌ژن محلول *لیشمانیا*	غلظت اینترفرون گاما در چاهک‌های دارای فیتوهماکلوتینین	اثر آنتی‌ژن داخل هر گروه	اثرمحرک‌های *PPD، آنتی‌ژن محلول *لیشمانیا* و میتوژن فیتوهماگلوتینین بین گروه‌ها
التیام‌پذیر	45/84±29/57	5344/85±1921/47	3017/58±/60 10272	p<0/001	P<0/001 ф
التیام‌ناپذیر	27/31±20/54	396/74±529/86	1776/18±/84 1500	p=0/049	
P-Value fi	0/113	<0/001	<0/001		

*:آنتی‌ژن PPD: Purified Protein Derivative

fi: نوع آزمون آماری به‌کاررفته تی‌تست بود.

ϕ: نوع آزمون آماری به‌کاررفته، آنالیز واریانس با اندازه‌های تکراری بود.

مقایسه سطح اینترفرون گاما در گروه بیماران مبتلا به سالک التیام‌پذیر نشان داد که سطح سایتوکاین در چاهک‌های تحریک‌شده با ✌PPD✍ به‌شکل معناداری از چاهک‌های تحریک‌شده با ✌آنتی‌ژن محلول *لیشمانیا* ✍ و ✌فیتوهماگلوتینین✍ کمتر بود ($p<0/001$) (جدول 2). در گروه سالک التیام‌پذیر، سطح اینترفرون گاما در چاهک‌های تحریک‌شده با ✌فیتوهماگلوتینین✍ به‌طور معناداری بیشتر از چاهک‌های تحریک‌شده با ✌آنتی‌ژن محلول *لیشمانیا* ✍ بود ($p<0/001$). در گروه بیماران مبتلا به سالک التیام‌پذیر، سطح اینترفرون گاما در چاهک‌های تحریک‌شده با ✌آنتی‌ژن محلول *لیشمانیا* ✍ و ✌فیتوهماگلوتینین✍ به‌شکل معناداری نسبت به چاهک‌های تحریک‌شده با ✌PPD✍ بیشتر بود ($p=0/049$).

نقطه برش مناسب اینترفرون گاما در چاهک

www.SID.ir

تحریک‌شده با آنتی‌ژن محلول *لیشمانیا* برای پیشگویی طبقه‌بندی بیمار در گروه سالک التیام‌ناپذیر و یا لیشمانیوز جلدی التیام‌پذیر برابر 1208پیکوگرم در میلی‌لیتر بود (حساسیت و ویژگی به ترتیب برابر با 87/5 درصد و 100 درصد و مساحت زیر نمودار[54] برابر 99/5 بود). از 8 بیمار مبتلا به سالک، سطح اینترفرون گامای 1 نفر بیشتر از نقطه برش تعیین‌شد.

بحث و نتیجه‌گیری

براساس نتایج این پژوهش، سطح ایترفرون گاما در بیماران مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر نسبت به بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی التیام‌پذیر کمتر بود. ارتباط بین تولید اینترفرون گاما و التیام زخم *لیشمانیا* در الگوهای حیوانی ثابت شده است ولی درباره ارتباط این سایتوکاین و مدت زمان بهبود زخم سالک در انسان، یافته‌های متضادی وجود دارد (12، 13 و 15). برای مثال، در مطالعه اژدری[55] و همکاران، سطح اینترفرون گامایی که سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در بیماران مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر تولید می‌کنند نسبت به افراد مبتلا به سالک التیام‌پذیر، به‌طور معناداری کمتر بود. در مطالعه یادشده سلول‌های تک‌هسته‌ای بیماران مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر رنگ‌آمیزی داخل‌سلولی شدند و درصد سلول‌های تولیدکننده اینترفرون گاما در بیماران مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر به‌طور معناداری کمتر از افراد بهبودیافته از سالک مشاهده شد (12) مطالعه کمپت[56] و همکاران نشان داد که سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی افراد بهبودیافته از سالک که در محیط‌کشت سلولی با آنتی‌ژن محلول *لیشمانیا* مواجه شده بودند توانایی تکثیر زیادی داشته و مقادیر فراوانی از سایتوکاین اینترفرون گاما تولید کردند (19). در مطالعه دیگری مشاهده شد که سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی بیماران مبتلا به سالک شدید مقاوم به درمان، توان تکثیر در برابر آنتی‌ژن محلول *لیشمانیا* را نداشتند و مقادیر کمی اینترفرون گاما در پاسخ به آنتی‌ژن یادشده تولید کردند (20). در مطالعه‌ای که غفار[57] و همکاران در سودان انجام دادند؛ مشخص شد که سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی بیماران مبتلا به سالک شدید مقاوم به درمان، مقادیر کمی اینترفرون گاما در پاسخ به آنتی‌ژن محلول *لیشمانیا* تولید می‌کنند(21). برخی پژوهش‌های دیگر نیز هایپراکتیویتی[58] سلول‌های Th1 و تولید مقادیر زیادی از اینترفرون گاما را در بیماران مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر نشان می‌دهند؛ برای مثال، در مطالعه حسینی[59] و همکاران سطح بیان ژن اینترفرون گاما در بیماران مبتلا به زخم مزمن سالک (زخم آنها بیش از 6 ماه طول کشیده بود) به‌شکل معناداری بیشتر از بیماران مبتلا به سالک حاد (زخم آنها در مدت کمتر از 4 ماه بهبود یافته بود) بود (15). همچنین در مطالعه اژدری و همکاران، اختلاف آماری معناداری در سطح اینترفرون گامایی که سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی تولید می‌کنند بین دو گروه بیماران مبتلا به زخم حاد و مزمن سالک (التیام‌ناپذیر) مشاهده نشد (13). علت تفاوت نتایج مطالعه ما با پژوهش‌هایی که وجود مقادیر فراوان اینترفرون گاما رادر بیماران مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر نشان می‌دهند را می‌توان به پاسخ‌ندادن به تولید اینترفرون گاما نسبت داد؛ به عبارتی، دو شکل از بیماری لیشمانیوز التیام‌ناپذیر مشاهده شد: در شکل اول، سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی نمی‌توانند مقادیر کافی اینترفرون گاما در پاسخ به آنتی‌ژن محلول *لیشمانیا* تولید کنند و در شکل دوم، لنفوسیت های تی

www.SID.ir

و سلول‌های کشنده طبیعی به مقدار مناسب و حتی بیشتر از حد معمول اینترفرون گاما تولید می‌کنند ولی گیرنده اینترفرون گاما و یا مولکول‌های پیام‌رسان درون‌سلولی به مقدار کافی داخل سلول‌های ماکروفاژ وجود ندارند. در واقع، بیان‌نشدن مقادیر کافی از گیرنده اینترفرون گاما و یا مولکول‌های پیام‌رسان داخل سلولی که مسئول فعال‌کردن ماکروفاژ در برابر عوامل بیماری‌زای داخل‌سلولی هستند، می‌تواند به پاسخ‌ندادن به سطوح زیاد اینترفرون گاما و ایجاد اشکال التیام‌ناپذیر سالک منجر شود. مکانیسم‌های مختلفی برای پاسخ‌ندادن به اینترفرون گاما مطرح شده‌اند که به نحوی با فرایندهای تنظیم ایمنی[60] فرد مبتلا به سالک در ارتباط هستند، از جمله می‌توان به کاهش بیان گیرنده اینترفرون گاما و همچنین کاهش مولکول‌های رونوشت‌برداری مؤثر در پاسخ به اینترفرون گاما اشاره کرد. در واقع، آلودگی حاصل از عفونت *لیشمانیا* می‌تواند به کاهش بیان گیرنده اینترفرون گاما منجر شود؛ به دنبال کاهش بیان گیرنده اینترفرون گاما، تولید اینترلوکین-12[61] و نیتریک‌اکساید[62] در ماکروفاژهای آلوده‌شده کاهش یافته و امکان بقای عوامل بیماری‌زای داخل‌سلولی در ماکروفاژهای آلوده افزایش می‌یابد. از سوی دیگر، مشخص شده است که ماکروفاژهای آلوده به اشکال پروماستیگوت و آماستیگوت انگل *لیشمانیا* مقادیر کمتری از مولکول‌های پیام‌رسان داخل‌سلولی مانند مولکول‌های STAT[63]، AP-1[64] و NF-κB[65] را بیان می‌کنند. مولکول‌های یادشده پس از اتصال اینترفرون گاما به گیرنده مربوطه فعال شده و می‌توانند به القای آثار التهابی اینترفرون گاما منجر شوند (22).

آزمون پوستی لیشمانین، واکنش ازدیاد حساسیت تأخیری[66] در پاسخ به اجسام کشته‌شده *لیشمانیا ماژور* در این مطالعه انجام شد. نتایج نشان دادند که اندوراسیون حاصل از آزمون جلدی لیشمانین در بیماران مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر به‌شکل معناداری از بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی التیام‌پذیر کمتر بود (جدول 2). نتایج حاصل از این پژوهش با یافته‌های حاصل از مطالعه گورین[67] و همکاران همخوانی داشت. در مطالعه یادشده مشخص شد که اندوراسیون حاصل از آزمون جلدی لیشمانین در بیماران مبتلا به لیشمانیوز التیام‌ناپذیر وجود نداشته و یا کم است. همچنین نتایج مطالعه یادشده، وجود اختلاف آماری معنادار در اندوراسیون آزمون جلدی بین افراد مبتلا به سالک برگشت‌پذیر[68] و لیشمانیوز بدون علامت[69] را نشان داد (23). مطالعه ما با پژوهشی که صادقیان[70] و همکاران انجام دادند هم‌سو نبود؛ در مطالعه یادشده ثابت شد که اندوراسیون حاصل از آزمون جلدی در بیماران مبتلا به سالک لوپوئید[71] نسبت به دیگر انواع سالک به‌شکل معناداری بیشتر است. همان‌طور که صادقیان و همکاران بیان کردند تفاوت در تظاهر کلینیکی بیماری سالک می‌تواند در میزان اندوراسیون زخم سالک مؤثر باشد. در مطالعه ما، تمام بیماران مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر مبتلا به شکل پلاک[72] بیماری سالک بوده و موردی از ابتلا به سالک لوپوئید مشاهده نشد؛ در نتیجه می‌توان علت تفاوت نتایج ما با مطالعه صادقیان و همکاران را در تفاوت تظاهر کلینیکی دانست (18).

نتایج حاصل از این پژوهش نشان دادند که اندازه ضایعه[73] حاصل از *لیشمانیا* اختلاف آماری معناداری بین دو گروه مبتلا به لیشمانیوز التیام‌ناپذیر و سالک التیام‌پذیر دارد (جدول 1). این یافته با پژوهش‌های قبلی انجام‌شده در الگوهای حیوانی و مطالعات انسانی هماهنگی داشت. به نظر می‌رسد تولید مقادیر بیشتر

www.SID.ir

اینترفرون گاما که در بیماران مبتلا به سالک التیام‌پذیر مشاهده شد به کاهش تعداد انگل موجود در موضع عفونت‌شده منجر می‌شود و روند التیام زخم را تسریع می‌کند (24).

با توجه به کارایی کم داروهای آنتی‌موان پنج‌ظرفیتی در بیماران مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر و نبود راهکار مشخص و همگانی برای درمان این دسته از بیماران از یک طرف و وجود درمان استاندارد برای بهبود بیماران مبتلا به سالک التیام‌پذیر از طرف دیگر، بر آن شدیم تا نقطه‌ای را در منحنی راک برای افتراق بیماران استفاده کنیم که بتواند تمام افراد مبتلا به سالک التیام‌پذیر را شناسایی کرده و در نتیجه تمام آنها با گلوکانتیم درمان استاندارد شوند. به این منظور، از نقطه‌ای استفاده شد که به ازای ویژگی 100 درصد، بیشترین حساسیت را داشت؛ این نقطه معادل اینترفرون گامای 1208 پیکوگرم در میلی‌لیتر در چاهک‌های تحریک‌شده با آنتی‌ژن محلول *لیشمانیا* بود. بر این اساس، حساسیت و ویژگی اینترفرون گامای تولیدی در نقطه برش 1208 پیکوگرم در میلی‌لیتر به‌ترتیب برابر 87/5 و 100 درصد بود؛ به این معنی که با اندازه‌گیری اینترفرون گاما می‌توان حدود 87 درصد بیماران مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر و تمام بیماران مبتلا به سالک التیام‌پذیر را تشخیص داد. در واقع، حساسیت 87/5 درصد در نقطه برش 1208 پیکوگرم در میلی‌لیتر به این معنی است که سطح اینترفرون گامای سلول‌های تک‌هسته‌ای 87 نفر از 100 بیمار مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر کمتر از 1208بوده و در مقابل سطح اینترفرون گامای 13 بیمار از 100 بیمار مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر بیشتر از 1208 است. با استفاده از نقطه برش تعیین‌شده می‌توان براساس میزان تولید اینترفرون گاما در مجاورت آنتی‌ژن محلول *لیشمانیا* راهکار مناسب درمانی را تعیین کرد. بر این اساس، در صورتی که میزان تولید اینترفرون گاما در بیمار مبتلا به سالک بیشتر از 1208 پیکوگرم در میلی‌لیتر باشد ازگلوکانتیم استفاده می‌شود که درمان استاندارد طلایی[۷۴] است (25). از سوی دیگر، باتوجه به ویژگی بالای نقطه برش تعیین‌شده (100درصد)، چنانچه میزان تولید اینترفرون گاما کمتر از 1208پیکوگرم در میلی‌لیتر باشد می‌توان از روش‌های جایگزین که عوارض جانبی کمتری دارند مانند درمان موضعی با تری‌کلرواستیک‌اسید[۷۵] 50 درصد استفاده کرد (26).

با توجه به نتایج این پژوهش و مطالعات مشابه، به نظر می رسد کاهش تولید اینترفرون گاما می‌تواند یکی از عوامل ایجاد اشکال التیام‌ناپذیر سالک محسوب شود. از این رو می‌توان با اندازه‌گیری میزان اینترفرون گامای تولیدشده در پاسخ به آنتی‌ژن اختصاصی *لیشمانیا*، گروهی از بیماران مبتلا به سالک التیام‌ناپذیر را شناسایی کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت آموزشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه بوعلی‌سینای همدان و معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان برای حمایتشان از انجام این پژوهش و از زحمات آقای دکتر خامسی پور،آقای دکتر حجازی و کارکنان مرکز تحقیقات بیماری‌های پوست و سالک دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تشکر می‌کنند.

References

(1) Rezvan H., Moafi M. An overview on *Leishmania* vaccines: A narrative review article. *Veterinary Research Forum* 2015; 6(1): 1-7.

www.SID.ir

(2) Norouzinezhad F., Ghaffari F., Norouzinejad A., Kaveh F., Gouya MM. Cutaneous leishmaniasis in Iran: Results from an epidemiological study in urban and rural provinces. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2016; 6(7): 614-619.

(3) Mortazavi H., Sadeghipour P., Taslimi Y., Habibzadeh S., Zali F., Zahedifard F., et al. Comparing acute and chronic human cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* and *Leishmania tropica* focusing on arginase activity. *Journal of the*

(4) Zamir M., Zaman G., Alshomrani AS. Sensitivity analysis and optimal control of anthroponotic Cutaneous *Leishmania*. *PloS one* 2016;11(8):e0160513.

(5) Dabirzadeh M, Hashemi M, Maroufi Y. Study of Genetic Variation of *Leishmania major* Based on Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1) in Chabahar, Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology* 2016; in press.

(6) de Vries HJ., Reedijk SH., Schallig HD. Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. *American journal of clinical dermatology* 2015; 16(2):99-109.

(7) Torpiano P., Pace D. Leishmaniasis: diagnostic issues in Europe. *Expert review of anti-infective therapy* 2015; 13(9): 1123-38.

(8) Abadi S., Fekri M., Dabiri S., Ardakani RF., Malaki LF., Rostami SA., et al. Design and validation of real time PCR: Quantitative diagnosis of common *Leishmania* species in Iran. A*rchives of Iranian Medicine (AIM)* 2016;19(7): 496-501.

(9) Mohammadzadeh M., Behnaz F., Golshan Z. Efficacy of glucantime for treatment of cutaneous leishmaniasis in Central Iran. *Journal of infection and public health* 2013; 6(2): 120-4.

(10) de Moura TR., Santos MLB., Braz JM., Santos LFV., Aragão MT., de Oliveira FA., et al. Cross-resistance of *Leishmania infantum* isolates to nitric oxide from patients refractory to antimony treatment, and greater tolerance to antileishmanial responses by macrophages. *Parasitology research* 2016; 115(2): 713-21.

(11) Paul C., Wolff S, Zapf T., Raifer H., Feyerabend TB., Bollig N., et al. Mast cells have no impact on cutaneous leishmaniasis severity and related Th2 differentiation in resistant and susceptible mice. *European journal of immunology* 2016; 46(1): 114-21.

(12) Ajdary S., Alimohammadian MH., Eslami MB., Kemp K., Kharazmi A. Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection. *Infection and immunity* 2000; 68(4): 1760-4.

(13) Ajdary S., Riazi-Rad F., Alimohammadian MH., Pakzad SR. Immune response to *Leishmania* antigen in anthroponotic cutaneous leishmaniasis. *Journal of Infection* 2009; 59(2): 139-43.

(14) Hoseini SG. Comparison of immune regulatory factors in early and late lesions of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*.*Experimental dermatology* 2012; 17: 513-8.

(15) Hoseini SG., Javanmard SH., Hejazi SH., Rafiei L., Zarkesh SH., Karbalaii K., et al. Comparison of immune regulatory factors in acute and chronic lesions of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania majo*r. *Journal of Research in Medical Sciences* 2014; 19(3): 36-40.

(16) Fletcher RH., Fletcher SW., Fletcher GS. Clinical epidemiology: the essentials. Fifth ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2012.

(17) Hepburn N. Cutaneous leishmaniasis. *Clinical and experimental dermatology* 2000; 25(5): 363-70.

(18) Sadeghian G., Ziaei H., Bidabadi LS., Nilforoushzadeh MA. Evaluation of leishmanin skin test reaction in different variants of cutaneous leishmaniasis. *Indian journal of dermatology* 2013; 58(3):239.

www.SID.ir

(19) Kemp M., Hey A., Kurtzhals J., RISTENSEN CC., Gaafar A., Mustafa M., et al. Dichotomy of the human T cell response to *Leishmania* antigens. I. Th1-like response to *Leishmania major* promastigote antigens in individuals recovered from cutaneous leishmaniasis. *Clinical & Experimental Immunology* 1994; 96(3): 410-5.

(20) Shahi M., Mohajery M., Shamsian SAA., Nahrevanian H., Yazdanpanah SMJ. Comparison of Th1 and Th2 responses in non-healing and healing patients with cutaneous leishmaniasis. *Reports of biochemistry & molecular biology* 2013; 1(2): 43.

(21) Gaafar A., Kharazmi A., Ismail A., Kemp M., Hey A., Christensen C., et al. Dichotomy of the T cell response to *Leishmania* antigens in patients suffering from cutaneous leishmaniasis; absence or scarcity of Th1 activity is associated with severe infections. *Clinical & Experimental Immunology* 1995; 100(2): 239-45.

(22) Kima PE., Soong L. Interferon gamma in leishmaniasis. *Frontiers in immunology* 2013; 4: 156.

(23) Guarín N., Palma GI., Pirmez C., Valderrama L., Tovar R., Saravia NG. Comparative immunohistological analysis of the Montenegro skin test reaction in asymptomatic infection and in acute and chronic cutaneous leishmaniasis. *Biomedica* 2006; 26: 38-48.

(24) Hurrell BP., Schuster S., Grün E., Coutaz M., Williams RA., Held W., et al. Rapid sequestration of *Leishmania mexicana* by neutrophils contributes to the development of chronic lesion. *PLOS Pathog* 2015; 11(5): e1004929.

(25) Nilforoushzadeh MA., Jaffary F., Derakhshan R., Haftbaradaran E. Comparison between intralesional meglumine antimoniate and combination of trichloroacetic acid 50% and intralesional meglumine antimoniate in the treatment of acute cutaneous Leishmaniasis: A randomized clinical trial. *Journal of Skin and Stem Cell* 2014; 1(1): e16633.

(26) Banihashemi M., Yazdanpanah MJ., Amirsolymani H., Yousefzadeh H. Comparison of lesion improvement in lupoid leishmaniasis patients with two treatment approaches trichloroacetic acid and intralesional meglumine antimoniate. *Journal of cutaneous medicine and surgery* 2015; 19(1): 35-9.

[1]- *Leishmania major(L. major)*
[2]- *Leishmania tropica (L. tropica)*
[3]- Polymerase Chain Reaction(PCR)
[4] - Real Time PCR
[5] - Sensitivity
[6] - Specificity
[7]- Internal Transcribed Spacer(ITS)
[8] - Kinetoplastid DNA(kDNA)
[9] - Heat Shock Protein 70(HSP-70)
[10] - Tryparedoxin Peroxidase
[11] - Allopurinol
[12] - Pentavalent Antimony
[13] - Glucantime
[14] - Pentostam
[15] - Type 1 T helper (Th1) cells
[16] -type 2 T helper (Th2) cells
[17] - Interferone-gamma
[18] - Cut-off Point
[19] - Follow-up
[20] - Novy-MacNeal-Nicolle (N.N.N)
[21] - Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)
[22] - Ficoll
[23]- Leishmanin Skin Test (LST)
[24] - Phosphate Buffer Saline (PBS)
[25] - Volar
[26] - Interadermal(Id)
[27] -Dorsal
[28] - Strongly Positive
[29] - Soluble Leishmania Antigen(SLA)
[30] -Fetal Calf Serum (FCS)
[31]- IU/ml
[32] - TRIS –HCL
[33] - Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)
[34] - Leupeptin
[35] - Phenyl methyl sulfonyl fluoride
[36]-Sigma
[37] - Cocktail protease inhibitor enzyme
[38] - L 90 K, ULTRACENTRIFUGE, USA
[39]- Bradford assay
[40]-Purified Protein Derivative(PPD)
[41]- Phytohemaglotinine (PHA)
[42] - Ebioscience
[43] - ELISA Reader
[44]-Awarness
[45] -Demographic
[46] - Statistical Package for the Social Sciences(SPSS)
[47] - Repeated Measure ANOVA
[48] - Pearson Chi-square
[49] - Fisher's exact test

www.SID.ir

[50] - Mann-whitney
[51] - t-test
[52]- Receive Operation Characteristic (ROC)
[53]-Body Mass Index(BMI)
[54] - Area under Curve(AUC)
[55]- Ajdary
[56] -Kemp
[57] - Gaafar
[58]- Hyperactivity
[59] - Hosseini
[60]- Immunoregulatory
[61] - Interleukin 12(IL-12)
[62] - Nitric Oxide (NO)
[63] -Signal transducer and activator of transcription(STAT)
[64] -Activator protein 1(AP-1)
[65] -nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells(NF-κB)
[66] -Delayed Type Hypersensitization(DTH)
[67] - Guarín
[68] - Refractory
[69] - Asymptomatic
[70] - Sadeghian
[71] - Lupoid
[72] - Plaque
[73] - Lesion Size
[74]-Golden Standard
[75] - Trichloroacetic Acid(TCA)

www.SID.ir