

Kutanöz Leishmanyazis Tanısında Direkt Mikroskopi, Kültür ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemlerinin Karşılaştırılması*

Comparison of Direct Microscopy, Culture and Polymerase Chain Reaction Methods for the Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis

Hatice ERTABAKLAR¹, Serçin ÖZLEM ÇALIŞKAN², Erengül BODUÇ¹, Sema ERTUĞ¹

¹ Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Aydın.

¹ Adnan Menderes University, Faculty of Medicine, Department of Parasitology, Aydın, Turkey.

² Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Aydın.

² Adnan Menderes University, Faculty of Medicine, Department of Biophysics, Aydın, Turkey.

* Bu çalışmanın bir bölümü, 7. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi (5-8 Haziran 2012, Ankara)'nde poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 25.08.2014 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 22.10.2014

ÖZ

Kutanöz leishmanyazis (KL), ülkemizde başta Güneydoğu Anadolu Bölgesi olmak üzere endemik olarak görülmekte ve son yıllarda Ege Bölgesi de dahil olmak üzere pek çok bölgeye yayılım göstermektedir. KL'nin tanısı, epidemiyolojik veriler, klinik belirtiler ve laboratuvar bulgularının birlikte değerlendirilmesine dayanmaktadır. Rutin tanıda en sık direkt mikroskopi ve kültür yöntemleri tercih edilmekte, moleküler yöntemler ise daha ziyade araştırma amaçlı olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, KL şüpheli olgulardan alınan örneklerde *Leishmania* spp. varlığının, direkt mikroskopi, kültür ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemleri ile araştırılarak sonuçların karşılaştırması amaçlanmıştır. Çalışmaya, Adnan Menderes Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Parazitoloji Laboratuvarına 2012-2014 yılları arasında başvuran 55 olgu dahil edilmiştir. Olguların deri lezyonlarından alınan örneklerden yayma hazırlanmış ve Giemsa ile boyanarak amastigot varlığı açısından direkt mikroskopik olarak incelenmiştir. Ayrıca alınan örnekler kültür için NNN besiyerine ekilmiş ve PCR için örneklerden DNA izolasyonu ticari bir kit (NucleoSpin Tissue® Kit, Macherey-Nagel, Almanya) kullanılarak yapılmıştır. PCR yönteminde, *Leishmania* spp. kinetoplast DNA'sının 116 baz çiftlik kısmını çoğaltan 13A ve 13B primerleri kullanılmıştır. Çalışmamızda, 55 örneğin 29 (%53)'ünde direkt incelemede amastigot varlığı görülmüş, 34 (%62)'ünün kültüründe promastigot varlığı saptanmış ve 30 (%55)'ünde PCR ile parazite özgül bant

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Hatice Ertabaklar, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, 09010 Aydın, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 505 605 5541, **E-posta (E-mail):** ertabaklarhatice@gmail.com

oluşumu gösterilmiştir. Olguların 24'ünde her üç yöntem ile de pozitif, 18'inde her üç yöntem ile de negatif sonuç alınmıştır. Yöntemlerden en az birinde pozitiflik saptanması dikkate alındığında 55 olgunun 37 (%67)'si KL tanısı almıştır. Buna göre, KL tanısı alan olguların %78.4 (29/37)'ünde direkt mikroskopi, %92 (34/37)'sinde kültür ve %81.1 (30/37)'inde PCR pozitifliği olduğu izlenmiştir; KL tanısında kültür yönteminin en duyarlı yöntem olduğu saptanmıştır. Kültür yöntemi altın standart olarak kabul edildiğinde, direkt mikroskopinin duyarlılığı %76.4, özgüllüğü %86; PCR'nin duyarlılığı %85.3, özgüllüğü ise %95 olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak, KL tanısında birden fazla yöntemin kullanılmasının duyarlılık ve özgüllüğü artıracağı ve daha çok sayıda olgunun tanımlanmasına olanak sağlayacağı düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: Kutanöz leishmaniyazis; tanı; kültür; direkt mikroskopi; polimeraz zincir reaksiyonu.

ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis (CL) is an endemic disease especially in Southeastern Anatolia of Turkey and recently shows a trend for spread to other regions of the country including the Aegean region. The diagnosis of CL is based on combined evaluation of epidemiological data with the clinical symptoms and laboratory findings. Direct microscopic examination and culture methods are mainly used in the routine diagnosis of CL, while molecular methods are mainly used for research. The aim of this study was to detect the presence of *Leishmania* spp. in samples obtained from CL-suspected patients by using direct microscopy, culture and polymerase chain reaction (PCR) methods and to compare the results. A total of 55 patients who were admitted to Parasitology Laboratory of Adnan Menderes University Hospital, Aydın (located at Aegean region in Turkey), between 2012-2014 were included in the study. Smear preparations from the skin lesions of cases were fixed and stained with Giemsa, and the presence of amastigote forms were evaluated by direct microscopy. NNN medium was used for the cultivation of samples. Total genomic DNA of *Leishmania* from the samples were extracted with a commercial kit (NucleoSpin Tissue® Kit, Macherey-Nagel, Germany) and PCR was performed by using 13A and 13B primers to amplify the 116 base pair fragment of *Leishmania* spp. specific kinetoplast DNA. Amastigotes were observed in 29 (53%) of the 55 samples by direct microscopy, promastigotes were detected among 34 (62%) samples in culture, and parasite-specific amplicons were revealed in 30 (55%) samples by PCR. All assays were positive in 24 patients while in 18 patients all of the tests yielded negative results. Thirty-seven (67%) out of 55 cases were diagnosed as CL when reactivity in at least one of these three methods were considered as positive. Accordingly the positivity rates of the methods were 78.4% (29/37) for direct microscopy, 92% (34/37) for culture and 81.1% (30/37) for PCR in CL-diagnosed patients, indicating culture as the most sensitive method. Regarding the culture method as gold standard, the sensitivity and specificity of direct microscopy were calculated as 76.4% and 86%, respectively, while PCR presented with 85.3% sensitivity and 95% specificity. In conclusion, it was thought that the usage of more than one method for CL diagnosis leads to increase the sensitivity and specificity which enables the diagnosis of a wide range of patients.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis; diagnosis; culture; direct microscopy; polymerase chain reaction.

GİRİŞ

Kutanöz leishmaniyazis (KL) *Leishmania* türlerinin etken olduğu, vektör kum sinekleri tarafından bulaştırılan tropikal ve subtropik ülkelerde sık görülen bir deri hastalığı olup, hastalık halk arasında şark çıbanı, halep çıbanı, sene yarası gibi isimlerle de anılmaktadır¹. Ülkemizde Güneydoğu Anadolu Bölgesinde endemik olarak görülmekte ve etkenin sıklıkla *Leishmania tropica* olduğu bilinmektedir. Son yıllarda Ege Bölgesi de dahil olmak

üzere pek çok bölgeye yayılan hastalık, Aydın ilinde de varlığını sürdürmektedir. Aydın ili KL açısından endemik bölge olup 1996-2004 yılları arasında 159 KL olgusu bildirilmiştir².

KL'nin tanısı, epidemiyolojik veriler, klinik belirtiler, olgunun hikayesi ve laboratuvar uygulamalarına dayanmaktadır. Ayırıcı tanıda hastalığın endemik olarak görüldüğü bölgeler de oldukça önemlidir ve endemik bölgede yaşamak veya endemik bölgeye seyahat öyküsü, KL için önemli bir epidemiyolojik tanı kriteridir. Klinik belirtiler, parazitin türü ve konak gibi çeşitli faktörlere göre değişebilmektedir³. Lezyonlar tipik olarak ağrısız, ülsere, kabuğu zor kalkan lezyonlar şeklinde, genellikle vücudun açıkta kalan yerlerinde bir veya daha fazla sayıda saptanabilmektedir. Hastalık pek çok deri lezyonu ile (bakteriyel deri enfeksiyonları, deri tüberkülozu, malign deri tümörleri, böcek ısırıkları, yabancı cisim granülomları, derin mikotik enfeksiyonlar, miyazis, tropikal ülser, sarkoidoz, şarbon, sporotrikoz, keratoakantoma vb.) karışabilmekte olup tanı amacıyla çok değişik teknikler kullanılmaktadır⁴. Doğru tanı, komplikasyonların azaltılması ve uygun tedavinin seçilmesi açısından önem taşımaktadır⁵. Parazitolojik tanı, lezyonun sağlam deri ile birleşme kenarından örnek alınarak, boyanan preparatta parazitin gösterilmesi ile konmaktadır. Alınan örnek besiyerlerine ekilirse, parazitin izolasyonu ve tanımlanması mümkün olabilmektedir. Bunlara ek olarak son yıllarda PCR gibi moleküler yöntemler de KL'de tanı amaçlı kullanılmaktadır⁶.

Bu çalışmada, Adnan Menderes Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Parazitoloji Laboratuvarına 2012-2014 yılları arasında başvuran KL şüpheli olgulardan alınan örneklerde *Leishmania* spp. varlığı, direkt mikroskopi, kültür ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemleri ile araştırılarak, sonuçların karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarına başvuran KL şüpheli 55 olgu dahil edildi. Tanı için alınan altı adet yayma örneğinin üçü Giemsa ile boyandı; diğerleri PCR testi uygulanıncaya kadar boyanmadan -20°C'de saklandı. Örnekler, lezyon ve çevresi %70'lik alkol ile iyice temizlenip, insülin enjektörü ile 0.2 ml serum fizyolojik, sağlam deri ile lezyonun sınırındaki lezyon yatağına enjekte edilip geri çekilerek alındı. Alınan örnekler lama yayıldıktan sonra, Giemsa ile boyanarak amastigot varlığı mikroskobik olarak araştırıldı. Amastigot görülen preparatlar pozitif, görülemeyenler ise negatif olarak değerlendirildi. Ayrıca alınan örnekler NNN besiyerine ekildi ve *Leishmania* promastigotları saptanan kültürler pozitif, saptanamayanlar negatif olarak değerlendirildi.

Saklanan yayma örneklerinden DNA izolasyonu, NucleoSpin Tissue® (Macherey-Nagel GmbH & Co, Almanya) kiti kullanılarak üretici firmanın önerilerine göre yapıldı. İzole edilen DNA'lar kullanıncaya kadar -20°C'de saklandı. *Leishmania* kinetoplast DNA'sının 116 baz çift (bc)'lik kısmını çoğaltan 13A: 5'-dGTGGGGGAGGGGCGTTCT-3' ve 13B: 5'-dATTTTACCAACCCCCAGTT-3' primerleri kullanılarak PCR uygulandı. PCR karışımı; 1-2 µl kalıp DNA, 0.4 pmol her bir primer, 0.5 U Taq DNA polimeraz, 0.2 mM

her bir dNTP, 3 µl 10x Taq polimeraz tamponu KCl, 2.5 mM MgCl₂ şeklinde hazırlandı ve distile su ile 30 µl'ye tamamlandı. PCR amplifikasyonu için TC-312 modeli ısı döngü cihazı kullanıldı ve amplifikasyon 94°C'de 10 dakika ön denatürasyon sonrası 30 döngü (94°C'de 60 sn, 60°C'de 60 sn ve 70°C'de 60 sn) ve 72°C'de 7 dakika son uzama olarak gerçekleştirildi. 8-10 µl PCR ürünü %2 agaroz jelde Tris Borik asit-EDTA (TBE) tampoonunda yürütüldükten sonra agaroz jel görüntüleme sistemi (Infinity ST5, Vilber Lourmat, Fransa) ile görüntüledi.

BULGULAR

Çalışmamızda değerlendirilen 55 olguya ait örneğin 29 (%53)'unda Giemsa boyama ile direkt incelemede amastigot varlığı saptanmış, 34 (%62)'ünde kültürde promastigot varlığı mikroskobik olarak gözlenmiş ve 30 (%55)'unda PCR ile parazite özgül bant oluşumu gösterilmiştir (Tablo I, Resim 1). Her üç yöntem de olguların 24'ünde pozitif, 18'inde negatif sonuç vermiştir (Tablo I). Yöntemlerden en az birinde pozitiflik saptanması dikkate alındığında 55 olgunun 37 (%67)'si KL tanısı almıştır. Buna göre, KL tanısı alan olguların %78.4 (29/37)'ünde direkt mikroskobik inceleme ile, %92 (34/37)'sinde kültür ile, %81.1 (30/37)'inde ise PCR ile pozitiflik saptanmıştır (Tablo II).

Kültür altın standart olarak alındığında, direkt mikroskopinin duyarlılığı %76.4, özgüllüğü %86; PCR'nin duyarlılığı %85.3, özgüllüğü ise %95 olarak hesaplanmıştır. PCR yöntemi altın standart olarak kabul edildiğinde, kültürün duyarlılığı %97, özgüllüğü %80, direkt mikroskopinin duyarlılığı %83, özgüllüğü %84 olarak bulunmuştur. Direkt mikroskopi referans olarak kabul edildiğinde ise, kültürün duyarlılığı %90, özgüllüğü %70; PCR'in duyarlılığı %86, özgüllüğü %81 olarak hesaplanmıştır.

TARTIŞMA

KL ülkemizde bildirimi zorunlu bir hastalık olup, Sağlık Bakanlığı verilerine göre 1990-2010 yılları arasında toplam 46.003 yeni olgu saptanmış, bu olguların çoğunluğunun Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde yoğunlaştığı bildirilmiştir⁷. Aydın ilinde ise 1996 yılından 2010 yılına kadar 436 olgunun rapor edildiği izlenmektedir^{2,8}. Ege Bölgesi'nde ve

Tablo I. Leishmania Tanısında Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırmalı Sonuçları (n= 55)

Direkt mikroskopi	Kültür	PCR	Olgu sayısı
+	+	+	24
-	-	-	18
-	+	+	5
-	+	-	3
+	-	-	2
+	+	-	2
+	-	+	1
29*	34*	30*	37*

* Pozitif olgu sayısı.



Resim 1. PCR yöntemi ile bazı olgulara ait *Leishmania* kinetoplast DNA'sının gen bölgesine özgü primerler ile amplifiye edilen 116 bp PCR ürünleri (M: Belirteç; P: Pozitif kontrol örneği; N: Negatif kontrol örneği; Hat 1-17: Olgulara ait *Leishmania* pozitif ve negatif örnekler).

Tablo II. KL Tanısı Konulan Olgularda Yöntemlerin Karşılaştırmalı Sonuçları (n= 37)

		Kültür					Kültür		
		Pozitif	Negatif	Toplam			Pozitif	Negatif	Toplam
Direkt mikroskopi	Pozitif	26	3	29	PCR	Pozitif	29	1	30
	Negatif	8	-	8		Negatif	5	2	7
Toplam		34	3	37	Toplam		34	3	37

Aydın ilinde farklı *Leishmania* türlerinin varlığı bilinmektedir. Deri lezyonları, etken olan *Leishmania* türüne göre değişiklikler göstermektedir. *Leishmania*'nın değişik türleri farklı klinik tablolara yol açabilmekte ve tanıda güçlük yaratabilmektedir.

KL tanısında en sık kullanılan yöntem, lezyondan hazırlanan ve Giemsa ile boyanan yaymada amastigot formunun görülmesidir^{9,10}. Ancak direkt mikroskopi (DM), kültür ve histopatolojik inceleme gibi klasik laboratuvar tanı yöntemlerinin seçiciliği yüksek olmasına karşın duyarlılığı düşük ve değişken olabilmektedir^{11,12}. Son yıllarda KL tanısında, ribozomal, "miniexon" veya "mini/maxicircle" kDNA gibi korunmuş veya değişken bölgelere ait sık tekrar eden değişik bölgeleri hedefleyen moleküler yöntemler kullanılmaktadır¹²⁻¹⁶. Moleküler bazlı yöntemlerin en önemli avantajının,

deri biyopsisi, kan, kemik iliği aspiratı, Giemsa boyalı preparatlar ve parafinize materyal gibi değişik klinik örneklerde bulunan az sayıdaki *Leishmania* DNA'sını saptayabilmesi olduğu bildirilmektedir. Doğru tanının, uygun tedavi seçiminde ve prognozun değerlendirilmesinde büyük önem taşıdığı bilinmektedir^{17,18}. Mohaghegh ve arkadaşları¹⁹, 2012 yılında yaptıkları çalışmada, deri lezyonu bulunan ancak yayma preparatı negatif 81 KL şüpheli olgunun 9 (%11.1)'unda PCR yöntemi ile pozitiflik saptadıklarını rapor etmişlerdir. Omidian ve arkadaşlarının²⁰ yaptığı çalışmada ise, yayma örneği negatif olan KL şüpheli 30 olgunun 5 (%16.4)'inde PCR yöntemi ile pozitiflik saptanmıştır. Çeliksöz ve arkadaşları²¹, KL'li olguların %52 (11/21)'sinde DM ile amastigot saptadıklarını ve %71 (15/21)'inde kültür yöntemi ile promastigotları tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Çalışmamızda ise KL'li 55 olgunun 29 (%53)'unda direkt mikroskopik inceleme ile amastigotlar görülmüş ve 34 (%62)'ünde ise NNN besiyerindeki kültürde promastigotlar üretilmiştir.

Rodriguez ve arkadaşlarının²² 233 olguda DM, kültür ve PCR yöntemlerini karşılaştırdıkları çalışmada, sırasıyla %63, %43 ve %97 oranında pozitiflik bulunmuş; Çulha ve arkadaşlarının²³ 25 olguda yaptıkları çalışmada ise, DM, kültür ve PCR pozitifliği sırasıyla %44, %68 ve %100 olarak bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda pozitiflik oranları DM, kültür ve PCR ile sırasıyla %53, %62 ve %55 olarak belirlenmiştir. Lemrani ve arkadaşları¹⁶, 26 olgudan alınan biyopsi örneğinde PCR'nin duyarlılığını %84.6, DM ve kültürün duyarlılığını %69.2 olarak saptamışlardır. Bensoussan ve arkadaşlarının¹⁷ çalışmasında, 92 yayma örneğinde PCR'nin duyarlılığı %98.7, DM ve kültürün duyarlılığı %83.3 olarak bildirilmiştir. Boggild ve arkadaşları²⁴ da duyarlılık oranlarını; PCR için %96.6, kültür için %84.7 ve DM için %66.1 olarak vermişlerdir. Bizim çalışmamızda ise DM, kültür ve PCR yöntemlerinin duyarlılıkları sırasıyla %78.4, %92 ve %81.1 olarak bulunmuştur. Diğer çalışmalara bakıldığında kültür yönteminin PCR yönteminden sonra ikinci duyarlı yöntem olduğu görülmekteyken, bizim çalışmamızda bu üç yöntem karşılaştırıldığında kültür yönteminin KL tanısında daha duyarlı bir yöntem olduğu saptanmıştır. Bunun sebebinin, örnek alımının uygun olması, örneklerin ekimi sırasında sterilizasyon koşullarına dikkat edilmesi, ekilen örneklerin düzenli kontrolleri ve kullanılan besiyerinin düzenli olarak yenilenmesi olduğu düşünülmüştür.

KL tanısında kullanılan DM ve kültür yöntemleri için, alınan örneğin morfolojik olarak bozulmamış ve yüksek sayıda canlı parazit içermesi gereklidir. Ancak hastalığın kronik fazında canlı parazit sayısı ve morfolojik olarak sağlam parazit sayısı düşüktür. Bu nedenle, KL tanısında direkt mikroskopik inceleme, kültür ve PCR yöntemlerinin birlikte uygulanmasının, duyarlılık ve özgüllüğü artıracağı, dolayısıyla tanıda birden fazla yöntemin kullanılmasının daha çok sayıda olgunun tanımlanmasına olanak sağlayacağı düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Özbel Y, Özensoy Töz S, Leishmaniosis, s: 199-241. Özcel MA , Özbel Y, Ak M (ed), Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. 2007, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını No: 22. Meta Basım Bornova, İzmir.
2. Ertabaklar H, Öncü S, Ertuğ S. A new focus for cutaneous leishmaniasis in the West Coast of Turkey. Trop Doct 2005; 35(3): 189.
3. Goto H, Lindosa JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis. Expert Rev Anti Infect Ther 2010; 8(4): 419-43.
4. Vega-Lopez F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. Curr Opin Infect Dis 2003; 16(2): 97-101.
5. Alvar J, Croft S, Olliaro P. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. Adv Parasitol 2006; 61: 223-74.
6. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2004; 27(5): 305-18.
7. Gürel MS, Yeşilova Y, Ölgün MK, Özbel Y. Türkiye'de kutanöz leishmaniasisin durumu. Türkiye Parazitol Derg 2012; 36(2): 121-9.
8. Ertuğ S, Aydın N, Gültekin B, Doyuran SE. Aydın ilindeki deri leishmaniasisi olgularının retrospektif incelenmesi. Türkiye Parazitol Derg 2002; 26(2): 140-2.
9. Turhanoğlu M, Erdal SA, Bayındır FB. Diyarbakır Eğitim ve Araştırma Hastanesinde dokuz yıllık kutanöz leishmaniasis olgularının değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bul 2014; 48(2): 335-40.
10. Salman İS, Vural A, Ünver A, Saçar S. Suriye iç savaşı sonrası Nizip'te kutanöz leishmaniasis olguları. Mikrobiyol Bul 2014; 48(1): 106-13.
11. Luz ZM, Silva AR, Silva Fde O, Caligiorne RB, Oliveira E, Rabello A. Lesion aspirate culture for the diagnosis and isolation of *Leishmania* spp. from patients with cutaneous leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104(1): 62-6.
12. de Oliveira CI, Bafica A, Oliveira F, et al. Clinical utility of polymerase chain reaction-based detection of *Leishmania* in the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. Clin Infect Dis 2003; 37(11): 149-53.
13. Özensoy Töz S, Özbel Y, Atay MG ve ark. İnsan ve köpeklerden alınan klinik örneklerle leishmaniasis tanısı için PZR uygulanması. Türkiye Parazitol Derg 2002; 26(3): 239-44.
14. Ergin M, Erdogan S, Gumurdulu D, Tuncer I. Cutaneous leishmaniasis: evaluation by polymerase chain reaction in the Cukurova region of Turkey. J Parasitol 2005; 91(5): 1208-11.
15. Reithinger R, Dujardin JC. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. J Clin Microbiol 2007; 45(1): 21-5.
16. Lemrani M, Hamdi S, Laamrani A, Hassar M. PCR detection of *Leishmania* in skin biopsies. J Infect Developing Countries 2009; 3(2): 115-22.
17. 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): 1435-9.
18. Blum J, Desjeux P, Schwartz E, Beck B, Hatz C. Treatment of cutaneous leishmaniasis among travelers. J Antimicrob Chemother 2004; 53(2): 158-66.
19. Mohaghegh M, Fata A, Salehi G, et al. Molecular identification of leishmania species using samples obtained from negative stained smears. Iran J Parasitol 2013; 8(2): 337-41.
20. Omidian M, Khosravi AD, Nazari M, Rashidi A. The comparison of histopathological findings and polymerase chain reaction in lesions with primary clinical diagnosis of cutaneous leishmaniasis with negative smear. Pak J Med Sci 2008; 24(1): 96-9.
21. Çeliksöz A, Saygı G, Özçelik S. Comparison of direct and culture methods in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis and the investigation of the effects of both trimethoprim-sulfamethoxazole and ofloxacin on promastigotes. First World Congress on Leishmaniasis. 5-9 May 1997, Istanbul. Abstracts, 21(S1): 110.

22. Rodriguez N, Guzman B, Rodas A, Takiff H, Bloom B, Convit J. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. *J Clin Microbiol* 1994; 32(9): 2246-52.
23. Culha G, Uzun S, Ozcan K, Memisoglu HR, Chang KP. Comparison of conventional and polymerase chain reaction diagnostic techniques for leishmaniasis in the endemic region of Adana, Turkey. *Int J Dermatol* 2006; 45(5): 569-72.
24. Boggild AK, Miranda-Verastegui C, Espinosa D, et al. Optimization of microculture and evaluation of mini-culture for the isolation of Leishmania parasites from cutaneous lesions in Peru. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 79(6): 847-52.