

Kütanöz Leşmanyazlı Olgularda Lezyondan Alınan Yayma Örneğinden PCR-RFLP ile *Leishmania* Türünün Araştırılması*

Determination of *Leishmania* Species by PCR-RFLP in the Smear Samples Taken from the Lesions of Cutaneous Leishmaniasis Cases

Hatice ERTABAKLAR¹, Sema ERTUĞ¹, Serçin Özlem ÇALIŞKAN², Bülent BOZDOĞAN³

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.

³ Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın.

³ Adnan Menderes University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Aydın, Turkey.

* Bu çalışma, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF-14002 proje numarası ile desteklenmiştir.

Geliş Tarihi (Received): 16.04.2015 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 26.02.2016

ÖZ

Ülkemizde ve bölgemizde *Leishmania* türlerinin neden olduğu hastalık formları kütanöz ve viseral leşmanyaz (sırasıyla, KL ve VL) olup, KL etkeninin sıklıkla *L.tropica* olduğu bilinmektedir. Ancak son yıllarda VL etkeni olarak bilinen *L.infantum*'un da KL etkeni olabileceği gösterilmiştir. KL tanısında direkt mikroskopi, serolojik testler ve kültür yöntemleri, kullanılan geleneksel yöntemlerdir. Bu yöntemlerin özgüllüğü yüksek olmakla birlikte duyarlılıkları değişkendir ve ayrıca tür tayini yapılamamaktadır. Son yıllarda, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temelli moleküler yöntemlerin kullanıma girmesi, tanı ve tiplendirmenin hızlı ve duyarlı olarak yapılmasına olanak sağlamıştır. Bu çalışmada, KL'li hastalarda hem tanı hem de tür tayinini aynı anda yapabilecek PCR-restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) yönteminin performansının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, 2012-2014 yılları arasında Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Laboratuvarına gelen KL şüpheli olguların deri lezyonlarından alınan örneklerden, mikroskopik incelemede *Leishmania* amastigotlarının saptandığı 30 yayma örneği dahil edilmiştir. Negatif kontrol olarak, *Staphylococcus aureus* (n= 5) ve *Candida albicans*'ın (n= 5) etken olduğu deri lezyonlarından alınan toplam 10 adet örnek kullanılmıştır. Yayma örneklerinden DNA izolasyonu,

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

ticari bir kit (Macherey-Nagel NucleoSpin Tissue® Kit, Almanya) kullanılarak yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak kültürde çoğaltılan *L.major*, *L.infantum* ve *L.tropica* promastigotlarından da aynı şekilde DNA izolasyonu yapılmıştır. PCR yönteminde, ITS (internal transcribed spacer)-1 bölgesini hedefleyen LITSR ve L 5.8S primerleri kullanılmıştır. RFLP yönteminde, amplifiye edilen PCR ürünleri, tür tayini yapmak amacıyla *BsuRI* (*HaeIII*) restriksiyon enzimi kullanılarak kesilmiş ve tüm örneklerde (n= 30) *L.tropica*'ya özgü bant görüntüsü saptanmıştır. Negatif kontrol olarak kullanılan örneklerin hiçbirinde (n= 10) bant saptanmamıştır. Çalışmamızda, Aydın ilinde en yaygın görülen türün *L.tropica* olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, KL'li hastaların klinik örneklerinde doğrudan hem parazitin tespiti hem de tür tayini için ITS-1 PCR-RFLP yönteminin, yeterli olanakları olan laboratuvarlarda rutin tanıda kullanılabileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Kütanöz leşmanyaz; *Leishmania*; tür tanımı; PCR-RFLP; ITS-1.

ABSTRACT

The forms of the disease caused by *Leishmania* species in Turkey as well as in Aegean region are cutaneous and visceral leishmaniasis (CL and VL, respectively), and the agent of CL is commonly *L.tropica*. However, *L.infantum* was also reported as being CL agent recently. Direct microscopic examination, serological tests and culture are the conventional methods used for the diagnosis of CL. Since the specificities of these methods are high their sensitivities are variable and identification at species level is not possible. Recently, the use of polymerase chain reaction (PCR)-based molecular methods enabled the rapid and reliable diagnosis and species identification. The aim of this study was to investigate the performance of PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) method both for the detection and identification of *Leishmania* species simultaneously in CL patients. A total of 30 smear samples that were positive for *Leishmania* amastigotes with microscopic examination, obtained from CL-suspected cases admitted to Adnan Menderes University Medical School Hospital, Parasitology Laboratory (located at Aydın, in the Aegean region of Turkey) between 2012-2014 period were included in the study. Ten samples taken from the skin lesions caused by *Staphylococcus aureus* (n= 5) and *Candida albicans* (n= 5) were also included as negative controls. DNA extractions from the smears were performed by the use of a commercial kit (Macherey-Nagel NucleoSpin Tissue® Kit, Germany). DNA isolation was also performed from *L.major*, *L.infantum* and *L.tropica* promastigotes that were grown in culture as positive controls. In PCR method LITSR and L5.8S primers targeting to ITS (internal transcribed spacer)-1 region were used. In RFLP method, the amplified PCR products were cleaved by *BsuRI* (*HaeIII*) restriction enzyme for the species identification. As a result, restriction profiles of all samples (n= 30) were in accordance with *L.tropica* restriction profile. No band was observed in the control samples (n= 10). The data of this study showed that the most common CL agent in Aydın is *L.tropica*. In conclusion, ITS-1 PCR-RFLP method may be used directly as a single routine procedure for both the detection and identification of *Leishmania* species in the clinical samples of CL patients, in laboratories with adequate facilities.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis, *Leishmania*; species identification; PCR-RFLP; ITS.

GİRİŞ

Hücre içi bir protozoon olan *Leishmania* türlerinin neden olduğu leşmanyaz, *Phlebotomus* cinsi sinekler ile bulaşmaktadır. Enfeksiyon, kütanöz, viseral ve mukokütanöz tutulum ile seyredabilmekte, yılda 350 milyondan fazla kişinin risk altında olduğu ve 1.5-2 milyon yeni olgu saptandığı bildirilmektedir¹. Ülkemizde kütanöz (KL) ve viseral (VL) leşmanyaz formları görülmekte olup, yılda 2000'in üzerinde KL olgusu bildirilmekte ve olguların büyük bir kısmının Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde olduğu dikkati çekmektedir^{2,3}. Buna

karşın Aydın ilinde de hastalığın her iki formu da saptanmaktadır, dolayısıyla ilimiz KL açısından batıdaki en önemli endemik bölgedir. Aydın ilinde 1996-2004 yılları arasında 159 KL olgusu bildirilmiştir⁴.

Leishmania türlerinin insanları enfekte eden 20 tür ve alt türü mevcuttur. Değişik alt türler ile oluşan KL'nin klinik görünümünün de farklı olduğu ve tanıda güçlük yaratabildiği belirtilmektedir². Hastalığın tanısında en sık kullanılan yöntemler; yayma, kültür ve histopatolojik inceleme olup, bu yöntemlerin farklı sonuçlar verebildiği, özgülüğü yüksek olmakla birlikte duyarlılığının düşük ya da değişken olduğu ifade edilmektedir⁵. Bu yöntemlerle *Leishmania* türü saptanamamakta, zamana ve deneyimli personele gereksinim duyulmaktadır. Son yıllarda, parazit DNA'sının farklı bölgelerini hedefleyen moleküler yöntemler de tanıda kullanılmaya başlanmıştır⁶. Moleküler yöntemlerin gelişmesiyle izolatların tür ayırımlarının yapılması mümkün olmuş ve klasik bilgiler değişmeye başlamıştır. Önceleri VL etkeni olan türlerin sadece iç organ tutulumu yaptığı düşünülürken, tür düzeyinde yapılan çalışmalarla bu bilgiler yenilenmiş; ayrıca, *L.tropica* ve *L.major*'e ek olarak *L.infantum*'un da KL'ye neden olduğu bildirilmiştir^{2,7-9}.

Bu çalışmada, KL tanısı almış olgulara ait *Leishmania* amastigot pozitifliği saptanan yayma örneklerinden, hem tanı hem de tür tayinini aynı anda yapabilecek ve rutin uygulamada tür düzeyinde sonuç verecek moleküler bir yöntemin [ITS (internal transcribed spacer)-1 bölgesini hedefleyen polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) - restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP)] denemesi hedeflenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, 2012-2014 yılları arasında, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarına gelen KL şüpheli olguların deri lezyonundan insülin enjektörü ile alınan örneklerden, *Leishmania* amastigotlarının saptandığı 30 yayma örneği dahil edildi. Yayma örnekleri PCR çalışılincaya kadar boyanmadan -20°C'de saklandı. Negatif kontrol olarak, *Staphylococcus aureus* (n= 5) ve *Candida albicans*'ın (n= 5) yol açtığı deri lezyonundan alınan toplam 10 adet örnek kullanıldı.

Saklanan yayma örneklerinden DNA izolasyonu, üretici firmanın önerilerine göre NucleoSpin Tissue® (Macherey-Nagel GmbH, Almanya) kiti kullanılarak yapıldı ve DNA örnekleri kullanılincaya kadar -20°C'de saklandı. Ayrıca kontrol amacıyla kültürde çoğaltılan *L.major*, *L.infantum* ve *L.tropica* promastigotlarından da aynı şekilde DNA izolasyonu yapıldı.

PCR yönteminde, primer olarak ITS-1 bölgesini hedefleyen LITSR: 5'-CTGGATCATTTT-CCGATG-3' ve L5.8S: 5'-TGATACCACCACTTATCGCACTT-3' primerleri kullanıldı¹⁴. 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 ve 2.5 mM MgCl₂ olarak hazırlandı ve distile su ile 30 µl'ye tamamlandı. PCR amplifikasyonu; 94°C'de 10 dk ön denatürasyon sonrası 35 döngü (94°C'de 30 sn, 49°C'de 30 sn ve 72°C'de 60 sn) ve 72°C'de 7 dk son uzama olacak şekilde programlanan ısı döngü cihazında yapıldı. 8-10 µl PCR ürünü, %1 SYBR Green içeren %2 agaroz jelde Tris borik asit-EDTA (TBE) tamponunda yürütüldükten sonra agaroz jel görüntüleme sistemiyle görüntülendi.

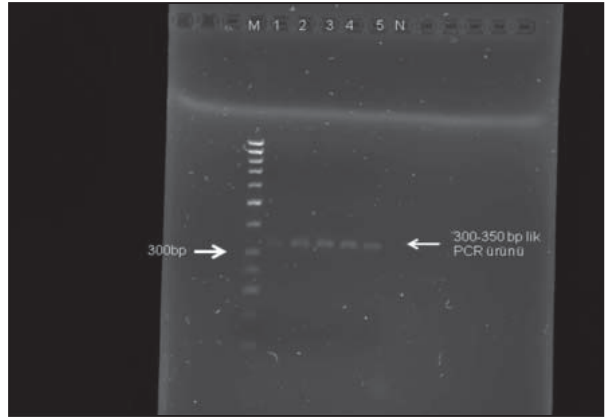
RFLP işlemi için, ultraviyole ışığı altında DNA parçalarının görüldüğü LITSR ve L5.8S primerleri ile amplifiye edilmiş PCR ürünleri, tür tayini yapmak amacıyla *BsuRI* (*HaeIII*) restriksiyon enzimi ile kesildi. Amplifiye olmuş her PCR ürününden 10 µL alınıp PCR tüplerine aktarıldı; üzerlerine 1 µL *BsuRI* enzimi, 2 µL restriksiyon tamponu ve 18 µL distile su ile eklendi ve karıştırılarak 37°C'de 4 saat inkübe edildi. Ürünler %2.5 agaroz jelde 50 baz çifti (bç) belirteç kullanılarak yürütüldü ve görüntülendi. Restriksiyon sonrası elde edilen bantlar, referans *L.tropica*, *L.infantum* ve *L.major* suşları ile karşılaştırılarak değerlendirildi¹⁰.

BULGULAR

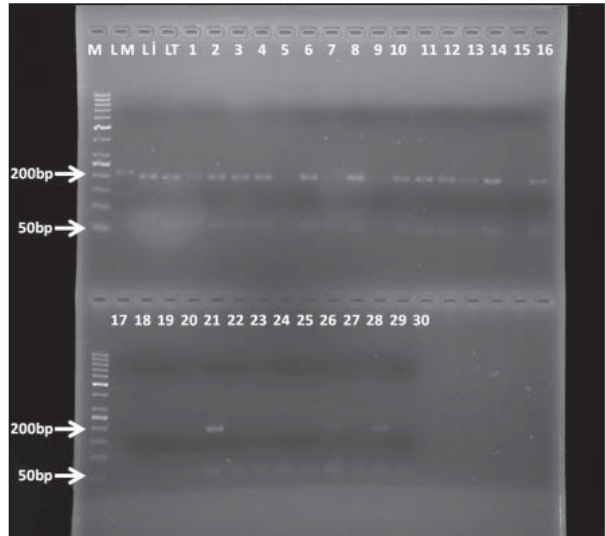
Leishmania amastigotları saptanan 30 yayma örneğinin tümünden DNA izolasyonları gerçekleştirilmiş ve PCR-RFLP analizi yapılarak görüntülenmiştir. PCR ürünleri incelendiğinde, ITS-1 bölgesinden beklenen 300-350 bç arasında *Leishmania*'ya özgü bantlar saptanmıştır (Şekil 1). RFLP sonuçları değerlendirildiğinde ise, tüm örneklerde *L.tropica*'ya özgü bantlar saptanmıştır (Şekil 2). Negatif kontrol olarak kullanılan *S.aureus* (n= 5) ve *C.albicans*'ın (n= 5) yol açtığı deri lezyonlarından alınan örneklerin hiçbirinde bant saptanmamıştır.

TARTIŞMA

Kütanöz leşmanyaz, ülkemizde ihbarı zorunlu bir enfeksiyon hastalığı olup, etkenin sıklıkla *L.tropica* olduğu bildirilmektedir⁴. Mevsimsel göçlerin artması ve ulaşımın kolaylaşması gibi nedenlerle ülkemizin Çukurova başta olmak üzere



Şekil 1. LITSR - L5.8S primerleri ile amplifiye olmuş bazı olgulara ait yayma örneklerinin PCR sonuçları. M: Moleküler belirteç; N: Negatif kontrol; Hat 1-5: Olgulara ait *Leishmania* pozitif örnekler.



Şekil 2. *BsuRI* (*HaeIII*) restriksiyon enzimiyle kesilmiş pozitif ve negatif (kontrol) olgulara ait örneklerin bir bölümünün RFLP sonuçları. M: Moleküler belirteç; LM: *L.major*; LI: *L.infantum*; LT: *L.tropica*; Hat 1-30: Pozitif ve negatif (kontrol) örnekler için sonuçlar.

Ege, Marmara, Orta Anadolu ve Batı Akdeniz gibi diğer bölgelerine de hastalığın yayıldığı bilinmektedir². İlimiz, Ege Bölgesi'nde KL açısından en önemli odaktır ve 1996 yılından beri olguların düzenli olarak saptandığı rapor edilmektedir. Ayrıca Aydın'da insanlar ve köpeklerde hastalığın visceral formu da görülmektedir^{11,12}. Dolayısıyla ilimizde, farklı *Leishmania* türleri endemik olarak bulunmaktadır. Bu nedenle, etkenin tür düzeyinde belirlenmesi, tanı, tedavi ve epidemiyolojik açılardan önem taşımaktadır. Önceleri ülkemizde, VL etkeni olarak *L.infantum*, KL etkeni olarak ise *L.tropica* ve *L.major* sorumlu tutulmakta iken, son yıllarda moleküler tekniklerin gelişmesiyle VL etkeni olarak bilinen *L.infantum*'un da KL'ye yol açtığı Adana bölgesinde gösterilmiştir^{2,8}. Serin ve arkadaşları¹³, 2005 yılında Adana ilindeki KL ve VL'li olgulardan izole ettikleri suşlarda *Leishmania*'nın mini-ekzon gen bölgesinin PCR ile amplifikasyonu ve *EaeI* restriksiyon enzimi kullanarak RFLP yaptıkları bir çalışmada, KL'li olguların %70'inde *L.tropica*, %30'unda *L.infantum*; VL'li olguların ise hepsinde *L.infantum* saptadıklarını bildirmişlerdir. Eroğlu ve arkadaşlarının¹⁴ 2015 yılında Adana ili ve çevresinde yaptıkları bir diğer çalışmada ise, *HaellI* restriksiyon enzimi ile KL'li olguların %48.6'sında *L.tropica*, %35.8'sinde *L.infantum* ve %15.6'sında *L.major* saptandığı bildirilmiştir.

Leishmania türlerinin saptanmasında biyokimyasal, immünolojik veya moleküler yöntemler tanımlanmıştır². Genotiplendirme çalışmalarında hedef bölge olarak; mini-ekzon gen tekrarları, beta- tubulin geni ve gp63 gen lokusu gibi çekirdek DNA'sı veya kinetoplast DNA'sı seçilebilmektedir. *Leishmania* türlerinde ITS bölgesi, nükleer DNA'da SSU (small subunit) ve LSU (large subunit) rRNA genleri arasında yer almakta ve *Leishmania* türlerini ayırabilecek derecede değişkenlik göstermektedir. ITS-1 PCR-RFLP'de bu gen bölgesinde 300-350 bp uzunluğundaki bir bölge hedeflenmekte ve bu yöntem, kan, doku gibi klinik örneklerden ve kültürden elde edilen parazitlerde kullanılabilir. Sadece bir enzim kullanılarak (*HaellI*), tıbbi önemi olan *Leishmania* türlerinin tümünün ayırt edilebilmesi, en önemli avantajdır^{10,15}. Marfurt ve arkadaşları¹⁶ 2003 yılında yaptıkları çalışmada, ITS-1 gen bölgesini *Hae III-Eae I* enzimiyle keserek, bu bölgenin tiplendirme için en uygun gen bölgesi olduğunu bildirmişlerdir. Böylece parazitin izolasyonu ve üretilmesine gerek olmadan, PCR-RFLP ile deri, kan ve kemik iliği gibi klinik örneklerden tek bir yöntem kullanılarak *Leishmania*'nın hem tanısı, hem de tür tayini yapılabilmektedir¹⁶. Gadisa ve arkadaşlarının¹⁷ 2007 yılında Etiyopya'da 55 KL şüpheli olguda *Leishmania* parazitinin ITS-1 gen bölgesi için L5.8S/LISTR primerlerini kullanarak yaptıkları tiplendirme çalışmasında, *L.aethiopic*'nin baskın tür olduğu bildirilmiştir. Tashakori ve arkadaşları¹⁸, aynı primerleri kullanarak İran'da en sık *L.major*'ün saptandığını; Eslami ve arkadaşları¹⁹ da 2014 yılında İran'da *HaellI* restriksiyon enzimi ile olguların %49'unda *L.major*, %51'inde ise *L.tropica* saptandığını bildirmişlerdir. Türkiye'nin sınır komşusu olan Suriye'de de KL etkeninin *L.major* olduğu bilinmektedir. İç savaş sırasında ülkemize çok sayıda Suriye vatandaşı sığındığından, KL açısından etken olarak farklı türler karşımıza çıkabilir. Salman ve arkadaşlarının²⁰ 2014 yılında Nizip'te 341'i Suriye mültecisi olmak üzere toplam 416 hasta örneğinde yaptıkları çalışmada, 77 hasta KL tanısı almış; bunların 62'sinin Suriye kökenli olduğunu rapor edilmiştir.

Dünyada birçok bölgede olduğu gibi, KL olgularına neden olan *Leishmania* türlerinin bilinmesi, tedavi yaklaşımları ve epidemiyolojik olarak hastalıkla mücadele açısından da oldukça önemli olup bu çalışma ile ilimizde tek bir test ile KL'de hem tanı, hem de tür düzeyinde sonuç verilmesi sağlanmıştır. İlimizdeki KL olgularının bir kısmını yansıtan ön araştırma olarak değerlendirilebilecek bu çalışmada, etkenin *L.tropica* olduğu görülmektedir. İlimiz açısından, epidemiyolojik olarak antropoonotik karakter gösteren *L.tropica* ile mücadele için, KL'li olguların erken saptanması ve tedavi edilmesi büyük önem taşımaktadır. Sonuç olarak, ülkemizde altyapısı uygun laboratuvarlarda ve/veya belirli merkezlerde PCR-RFLP'nin KL olgularında hem tanı hem de tür düzeyinde etkenin saptanması amacıyla kullanılabilirliği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004; 27(5): 305-18.
2. 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.
3. Ok UZ, Balcioğlu IC, Taylan Ozkan A, Ozensoy S, Ozbel Y. Leishmaniasis in Turkey. *Acta Trop* 2002; 84(1): 43-8.
4. Ertabaklar H, Öncü S, Ertug S. A new focus for cutaneous leishmaniasis in the West Coast of Turkey. *Trop Doct* 2005; 35(3): 189.
5. 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.
6. Özensoy Töz S, Özbel Y, Atay MG ve ark. İnsan ve köpeklerden alınan klinik örneklerle leishmaniasis tanısı için PCR uygulanması. *Türkiye Parazit Derg* 2002; 26(3): 239-44.
7. Reithinger R, Dujardin JC. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J Clin Microbiol* 2007; 45(1): 21-5.
8. 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.
9. Svobodova M, Alten B, Zidkova L et al. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* transmitted by *Phlebotomus tobbi*. *Int J Parasitol* 2009; 39(2): 251-6.
10. Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diag Microbiol Infect Dis* 2003; 47(1): 349-58.
11. Ertuğrul MB, Ertabaklar H, Uyar G, Ertuğ S, Sakarya S. Bir olgu nedeniyle visceral leishmaniasis tanı ve tedavisinin tartışılması. *ANKEM Derg* 2005; 19(1): 48-51.
12. Atasoy A, Paşa S, Ozensoy Töz S, Ertabaklar H. Seroprevalence of canine visceral leishmaniasis around the Aegean Cost of Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2010; 16(1): 1-6.
13. Serin MS, Daglioglu K, Bagirova M, et al. Rapid diagnosis and genotyping of *Leishmania* isolates from cutaneous and visceral leishmaniasis by microcapillary cultivation and polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism of minixon region. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 53(3): 209-14.
14. Eroglu F, Koltas IS, Alabaz D, Uzun S, Karakas M. Clinical manifestations and genetic variation of *Leishmania infantum* and *Leishmania tropica* in Southern Turkey. *Exp Parasitol* 2015; 154(1): 67-74.
15. Kuhls K, Mauricio IL, Pratlong F, Presber W, Schönian G. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. *Microbes Infect* 2005; 7(11-12): 1224-34.

16. 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): 115-24.
17. Gadisa E, Genetu A, Kuru T, et al. *Leishmania* (Kinetoplastida): species typing with isoenzyme and PCR-RFLP from cutaneous leishmaniasis patients in Ethiopia. *Exp Parasitol* 2007; 115(4): 339-43.
18. Tashakori M, Kuhls K, Al-Jawabreh A, et al. *Leishmania major*: genetic heterogeneity of Iranian isolates by single-strand conformation polymorphism and sequence analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer. *Acta Trop* 2006; 98 (1): 52-8.
19. Eslami G, Hajimohammadi B, Jafari AA, et al. Molecular identification of *Leishmania tropica* infections in patients with cutaneous leishmaniasis from an endemic central of Iran. *Trop Biomed* 2014; 31(4): 592-9.
20. Salman IS, Vural A, Unver A, Saçar S. Cutaneous leishmaniasis cases in Nizip, Turkey after the Syrian civil war. *Mikrobiyol Bul* 2014; 48(1): 106-13.