در
پژوهش و سازندگی
امور دام و آبزیان شماره ۸۰ پاییز ۱۳۸۷

تشخیص و شناسایی گونه های لیشمانیا در زخم های پوستی با روش PCR در اصفهان

• علیرضا کیخسروی
دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، دانشگاه تربیت معلم سبزوار
• ناصر گلبانگ
دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، دانشگاه اصفهان
• علی اکبر جهانگیرنژاد
دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، دانشگاه اصفهان
تاریخ دریافت: اسفند ماه ۱۳۸۵ تاریخ پذیرش: آبان ماه ۱۳۸۶
Email: akeykhosravi @yahoo.com

چکیده

این مطالعه در شهر اصفهان که یکی از مناطق آلوده به لیشمانیوز پوستی در ایران است، انجام شد. جمع آوری نمونه از ۱۰۸ بیمار دارای زخم های مشکوک به لیشمانیوز پوستی صورت گرفت. نمونه برداری با استفاده از برداشتن مایع مترشحه از زخم به وسیله کاغذ صافی، جهت انجام PCR و تهیه گسترش میکروسکپی به روی لام، جهت انجام مطالعات میکروسکوپی انجام گرفت. پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه با نواحی حفاظت شده kDNA باند می شدند به طوری که دو بخش تکثیر شده مختلف از kDNA شناسایی شد. تک باند شناسایی شده در ۶۲۰ bp به عنوان *Leishmania major* (MRHO/SU/ ۵۹ /Pstrain) و تک باند شناسایی شده در ۸۳۰ bp به عنوان *Leishmania tropica* (MHOM/sudan /۵۸/ OD) معرفی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که حساسیت روش PCR با روش گسترش میکروسکوپی یکسان است. البته در صورتیکه نمونه های گرفته شده بدون استفاده از محیط کشت جهت فرایند PCR استفاده شوند. در ادامه می توان ادعا کرد با توجه به این که روش PCR روشی حساس است عدم تایید همه نمونه ها را می توان به وجود ممانعت کننده ها نسبت داد. بطوریکه اگر از نمونه های انگل موجود در محیط کشت جهت PCR استفاده شود، احتمال تایید نمونه ها بسیار بیشتر می شود. از روش PCR می توان در تمایز و شناسایی گونه های لیشمانیا جهت مطالعات اپیدمیولوژیک و تهیه واکسن استفاده کرد.

کلمات کلیدی: KDNA، لیشمانیوز پوستی، میکروسکوپ، اپیدمیولوژیک، PCR(Polymerase chain reaction)

Pajouhesh & Sazandegi No 80 pp: 121 - 125

Evaluation of PCR method for diagnosis and identification of leishmania species in cutaneous lesions

By: Keykhosravi. A,Animal Group - Department of Biology – Teacher Training Univarsity of Sabzevar, Golbang. N. Animal Group - Department of biology – Faculty of Science – Isfahan University and Jahangirnejad. A. Microbiology Group - Department of Biology – Faculty of Science – Isfahan University.

This study, was carried out in Isfahan an endemic region in Iran. A total of 108 samples of patients with cutaneous lesion were sampled for study that were suspected to cutaneous leishmaniasis. For comparison and study, sampling was carried out with to take of lesion exudates by filter paper for PCR. Small amount of material to take for microscopic smear examination. The PCR primers were designed to bind within the conserved regions of kDNA (kinetoplast DNA). In this study, two different amplified fragments for two species were identified from the kDNA. A band in 620 bp was identified for Leishmania major (MRHO/SU/59/P strain) and a band in 830 bp was identified for *Leishmania tropica* (MHOM/sudan/58/OD). Result of this study represented when samples be used for PCR with out cultured in medium, sensitivity of PCR and microscopic smear examination methods are equal. Infact, reason of some sample unconfirmed by PCR method is inhibitor presence. The PCR method is more precise to confirm If the samples cultured in medium and then PCR done. PCR can be used for differentiation and identification of Leishmania species in epidemiologic studies and vaccine product.

Key words: kDNA, Cutaneous leishmaniasis, Microscope, Epidemiologic, Polymerase chain reaction (PCR).

مقدمه

لیشمانیوز نوعی بیماری است که به وسیله پروتوزوئری درون سلولی از جنس لیشمانیا ایجاد می شود. سازمان بهداشت جهانی لیشمانیوز را به عنوان یکی از مهم ترین بیماری های انگلی به حساب می آورد که تقریباً ۲۵۰ میلیون نفر در خطر ابتلا به این بیماری هستند. این بیماری بومی ۸۸ کشور جهان است و در همه قاره ها به استثناء قطب واسترالیا دیده می شود. انگل لیشمانیا دارای اشکال بی‌تاژک و تاژک‌دار است که به ترتیب در بافت های مهره‌داران و بی‌مهرگان دیده میشود. اشکال بالینی این بیماری شامل لیشمانیوز احشایی، پوستی و پوستی- مخاطی می باشند. در لیشمانیوز پوستی انگل محدود به پوست است و سبب ایجاد زخم هایی می شود که بعد از بهبود اثرشان باقی می ماند (۸، ۹). ایران از مناطق بومی لیشمانیوز پوستی می باشد و این عارضه در ۱۱ استان از ۲۸ استان آن گسترش دارد. اصفهان از استان های اصلی شیوع این بیماری می باشد (۱۲).

در حال حاضر برای تشخیص لیشمانیا در کلینیک ها از روش های مشاهده مستقیم انگل مانند آزمون میکروسکوپی و کشت استفاده می شود به طوریکه هیچ کدام از این دو روش نمی تواند به طور اختصاصی برای تمایز گونه های لیشمانیا بکار رود. اخیراً آزمون های مولکولی مانند PCR برای تشخیص و شناسایی لیشمانیا در نمونه های بالینی استفاده شده است. این آزمون ها با توجه به حساسیت بالا در شناسایی حداقل میزان DNA انگل از اهمیت بالایی برخوردار است (۴، ۸). دراین تحقیق از PCR برای تمایز گونه های لیشمانیا استفاده شد.

کینتوپلاست یک اندامک مشابه میتوکندری است که محتوی دو نوع از مولکول های DNA حلقوی است. مولکول های بزرگتر که تقریباً ۵۰ عدد است، Maxicircle نامیده می شوند و محتوی ژن های میتوکندریایی مانند سیتوکروم هستند. نوع دوم از هزاران DNA حلقوی کوچک زنجیروار تشکیل شده اند و minicircle نامیده می شوند (۷). این حلقه های کوچک به همراه DNA ریبوزومی اهداف مناسبی برای PCR هستند، زیرا نسخه های متعددی از آنها وجود دارند و دارای نواحی حفاظت شده و متغیر هستند. اگر در آزمون PCR، پرایمرها برای DNA کینتوپلاست هدف دار شوند، حساسیت PCR بیشتر می شود (۶).

هدف مطالعه حاضر ارزیابی تشخیص لیشمانیوز پوستی و شناسایی گونه های لیشمانیای مولد آن به وسیله PCR در مقایسه با روش میکروسکوپی بود. تمایز گونه های لیشمانیای مولد سالک با کمک روش PCR از اهداف دیگر این مطالعه بود که اقدامات ابتدایی در جهت تهیه واکسن می باشد. درابتدای مبتلا شدن به این بیماری، با در نظر گرفتن تعداد کم انگل لیشمانیای موجود در زخم، امکان تایید بیماری با آزمون میکروسکوپی بسیار ضعیف است. با توجه به حساسیت بالای روش PCR به حداقل میزان DNA، این آزمون می تواند به عنوان روشی مناسب و سریع جهت شناسایی انگل در ابتدای ابتلا به این بیماری مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

.نمونه ها از بیمارانی که در فاصله زمانی فروردین ماه ۸۳ تا آبان ماه ۸۳ به مرکز پوست و سالک استان اصفهان مراجعه کرده بودند، جمع آوری شد. نمونه برداری از ۱۰۸ بیمار دارای زخم های مشکوک به لیشمانیوز پوستی انجام شد. از مجموع بیماران مورد مطالعه ۶۱ بیمار مذکر(۵۶/۵ درصد) و ۴۷ بیمار مونث (۴۳/۵ درصد) بودند. از این تعداد بیمار ۲۴ نفر(۲۲/۲ درصد) ۱۰ سال یا کمتر از آن، ۴۵ نفر (۴۱/۶ درصد) بین ۲۰-۱۱، ۱۴ نفر (۱۲/۹ درصد) بین ۳۰-۲۱، ۱۶ نفر(۱۴/۸ درصد) بین ۴۰-۳۱ و ۹ نفر

(۸/۳ درصد) بیش از ۴۱ سال سن داشتند. در ۴۵ درصد از بیماران تنها یک زخم وجود داشت که قطر آن از ۱ سانتیمتر تا ۱۰ سانتیمتر متفاوت بود و در ۵۵ درصد از بیماران تعداد زخم ها ۲ و یا بیشتر از آن بود.

جهت آزمون PCR، نمونه‌های استاندارد (Gold standard) گونه‌های *L.major*(MRHO /۵۹/P strain) و *L.tropica*(MHOM /۵۸/OD) از مرکز تحقیقات پوست و سالک اصفهان تهیه شد. این سویه ها ابتدا به محیط کشت NNN و سپس به محیط کشت RPMI-۱۶۴۰ منتقل شدند. در ادامه از نمونه هایی که دارای زخمهای غیر لیشمانیوز پوستی بودند (مانند زخم های ناشی از زرد زخم) به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

برای نمونه برداری کاغذ صافی هایی در اندازه های ۳×۱ میلیمتر تهیه شد و درون لوله درب دار اتوکلاو شد. ابتدا با استفاده از تیغ جراحی خراش هایی در حاشیه زخم ایجاد شد و مایع مترشحه حاصل به آهستگی با کاغذ صافی جذب و درون تیوب انداخته شد. از هر نمونه جهت مطالعه میکروسکپی یک گسترش روی لام تهیه شد و به روش گیمسا رنگ آمیزی گردید. در پایان نتایج حاصل از بررسی های میکروسکپی با نتایج PCR مورد مقایسه قرار گرفت(۷).

در این مطالعه روشی ساده برای استخراج DNA استفاده شد: ابتدا به هر تیوب حاوی نمونه ۵۰ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر شده اضافه شد. نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری جوشان، قرار داده شدند. سپس نمونه ها در rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. به محلول رویی به نسبت ۰/۱ حجم استات سدیم M۳ افزوده شد و به مدت ۱۰ ثانیه مخلوط شد، سپس به نسبت دو برابر حجم نمونه الکل ۹۵ درجه سرد اضافه شد. نمونه ها به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد قرار گرفتند و سپس در rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. مایع رویی دور ریخته شد و تیوب ها به صورت درباز در محیط قرار داده شد تا مایع باقیمانده درون تیوب کاملاً تبخیر شود. سپس درون هر کدام از تیوب ها ۳۰ میکرولیتر بافر (Tris-EDTA) TE ریخته شد. در پایان نمونه ها تا زمان مورد استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. (۷).

پرایمرها با سفارش به شرکت فزاپژوه تهران (فن آوری زیستی و آزمایشگاهی) و توسط شرکت PRIMM انگلیس ساخته شد. توالی این پرایمرها به‌صورت زیر می باشد:

۱۳Z: ۵′-TCG-CAG-AAC-GCC-CCT-ACC-۳′ Tm = ۶۰ ℃

۱۳Y: ۵′-AGG-GGT-TGG-TGT-AAA-ATA-GGC-۳′ Tm = ۶۲ ℃

این جفت پرایمر، قطعاتی از kDNA گونه های لیشمانیای عامل لیشمانیوز جلدی را تکثیر می نمایند. مخلوط ۲۵ µl از واکنش PCR شامل ۱ mM DNTP، ۰/۱۵ mM از هر پرایمر، ۱ واحد Polymerase Taq DNA، ۲mM از $MgCl_2$ و ۵۰۰mM KCL، Tris PCR و ۲۰۰mM می باشد. در پایان به هر مخلوط به میزان ۳ µl DNA الگو اضافه شد. مخلوط فوق در یک ماشین PCR مدل Eppendorff AG۲۲۳۳۳۱ قرار داده شد و ابتدا در ۹۳ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه جهت جدا شدن ابتدایی DNA قرار گرفت. سپس ۳۵ چرخه تکثیر PCR شامل جدا شدن DNA در ۹۳ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در ۶۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و تکثیر در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱/۵ دقیقه انجام شد. در پایان نمونه ها در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه جهت کامل شدن واکنش تکثیر انکوبه شدند. محصول PCR پس از تکثیر جهت الکتروفورز در روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در حضور اتیدیوم بروماید (۰/۵ میکروگرم در میکرولیتر) قرار گرفت و به مدت ۱ ساعت در ۹۰ ولت جاری شد و با نور ماوراء بنفش مشاهده گردید (۷و۱۱).

نتایج

در میان ۱۰۸ نمونه، ۷۰ مورد (۶۴/۸ درصد کل نمونه ها) به وسیله روش گسترش میکروسکوپی تایید شدند. این آزمون فقط برای تشخیص لیشمانیوز قابل استفاده است ولی قادر به شناسایی گونه های لیشمانیا نیست.

در آزمون PCR، ۶۸ نمونه (۶۲/۹ درصد از کل نمونه ها) از مجموع ۱۰۸ نمونه، تایید شدند مقایسه نتایج حاصل از PCR نمونه های گرفته شده و نمونه های استاندارد نشان داد که باند موجود در ۶۲۰ bp معرف گونه *L. major*(MRHO /۵۹/P strain) و باند موجود در ۸۳۰ bp معرف گونه *L.tropica*(MHOM /۵۸/OD) بود. (شکل های ۱ و ۲).

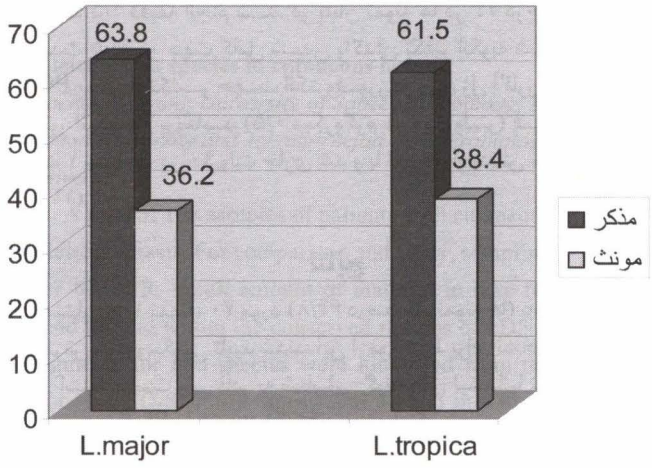
همانطور که اشاره شد آزمون PCR در ۶۲/۹ درصد نمونه ها مثبت بود و آزمون میکروسکوپی نیز در ۶۴/۸ درصد نمونه ها مثبت بود. در این آزمون فقط ۲ نمونه که توسط PCR منفی بودند با روش میکروسکوپی مثبت ارزیابی شدند(جدول ۱). در این بررسی ما شاهد باند های غیر اختصاصی در نمونه های بیماران لیشمانیوز پوستی بودیم که با مقایسه با نمونه های استاندارد، مشخص شد که مربوط به DNA انسانی است. به منظور تعیین حساسیت روش PCR برای نمونه های kDNA تکثیر شده، در ۸ تیوب دارای مخلوط PCR به ترتیب میزان ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳، ۳/۵ و ۴ میکرولیتر DNA الگو ریخته شد. اطلاعات موجود در شکل ۳ نشان می دهد این تکنیک حتی ۰/۵ میکرولیتر از DNA را می تواند تکثیر کند.

با توجه به نتایج حاصل، ۶۸ نمونه به روش PCR تایید شد که ۵۵ نمونه (۸۱ درصد) از گونه *L. major* و ۱۳ نمونه (۱۹ درصد) از گونه *L. tropica* بود. از ۵۵ نمونه ای که عامل سالک *L. major* شناخته شد، ۳۵ نمونه (۶۳/۸ درصد) مذکر و ۲۰ نمونه (۳۶/۲ درصد) مونث بودند. همچنین از ۱۳ نمونه ای که عامل سالک *L. tropica* شناسایی شد ۸ نمونه (۶۱/۵ درصد) مذکر و ۵ نمونه (۳۸/۴ درصد) مونث بودند (نمودار ۱).

براساس نتایج حاصل از این مطالعه گونه انگل غالب لیشمانیای مسبب سالک در اصفهان *L. major* بود و با توجه به آنکه فعلاً اطلاعاتی در مورد توالی باند های بدست آمده از این سویه ها در دست نیست، میتوان چنین حالتی را در نظر گرفت که در دو گونه طول مینی سیرکل ها با یکدیگر متفاوت است و در نتیجه قطعات متفاوتی را تکثیر می کنند.

جدول ۱. مقایسه نمونه های تایید شده توسط آزمون میکروسکوپی و PCR

موارد مثبت لام		موارد مثبت PCR		کل نمونه ها
درصد	تعداد	درصد	تعداد	
۶۴/۸	۷۰	۶۲/۹	۶۸	۱۰۸



نمودار۱. فراوانی جنس بیماران در گونه های تعیین شده

بحث

همه گونه های لیشمانیا، به جز تفاوت های ناچیز در اندازه که قابل استناد نمی باشد، از لحاظ مورفولوژیکی مشابه یکدیگر هستند (۲). در این مطالعه نیز به نتایج مشابهی دست یافتیم به طوریکه در مقایسه گسترش های گرفته شده از بیماران که حاوی هر دو گونه *L. major* و *L. tropica* بود هیچ تفاوتی از لحاظ شکل ظاهری مشاهده نشد (۲).

با توجه به بررسی های Schonian و همکاران در مورد PCR مستقیم نمونه های گرفته شده از بیماران و یافته های این مطالعه میتوان ادعا کرد که روش PCR دارای حساسیت بالایی می باشد. و عدم تایید بعضی نمونه ها را می توان به وجود ممانعت کننده ها نسبت داد (۱۰). Edurado و همکارانش در سال ۲۰۰۲ با ارزیابی PCR در مورد تشخیص لیشمانیوز پوستی آمریکایی بیان می کند این تکنیک، در زمان PCR مستقیم نمونه های بیماران مبتلا به لیشمانیوز پوستی، دارای حساسیت بالایی نمی باشد و محدوده این حساسیت بین ۶۰ تا ۸۰ درصد است و در ادامه تاکید می کند استفاده از محیط کشت می تواند حساسیت این آزمون را بطور قابل توجهی بالا ببرد(۳). علاوه بر این، تکنیک حاضر در مورد نمونه های گرفته شده از بیماران مبتلا به لیشمانیوز پوستی در دنیای جدید (آمریکای شمالی و جنوبی)، جواب بهتری نسبت به نمونه های بیماران دنیای قدیم (آسیا، اروپا و آفریقا) می دهد. با استناد به مطالب بالا می توان گفت که نتایج حاصل از این مطالعه با توجه به استفاده از نمونه های دنیای قدیم و استفاده از روش مستقیم با نتایج مطالعات Edurado مطابقت دارد. روش میکروسکوپی با توجه به هزینه کم، سادگی و حساسیت نسبتاً خوب، روش مناسبی جهت تشخیص است و روش PCR در آزمایشگاه می تواند در تعیین گونه های موجود در مناطق بومی، جهت درمان اختصاصی بیماری، کارهای اپیدمیولوژیک، تهیه واکسن و تمایز گونه ها استفاده شود (۷). یکی از مشکلاتی که در زمان تشخیص بیماری از راه آزمون میکروسکوپی وجود دارد، نمونه برداری سطحی (که باعث کمبود تعداد انگل در گسترش می شود) از زخم ها و نمونه برداری از زخم های در حال بهبود می باشد، که در آزمون PCR این محدودیت وجود ندارد. حال می توان گفت که نتایج حدوداً مشابهی بین یافته های PCR و تهیه گسترش در این بررسی و دیگر بررسی ها وجود دارد (۱، ۱۰).

دلایل اختصاصی بودن PCR که باعث انتخاب این روش شد شامل موارد زیر میباشد:

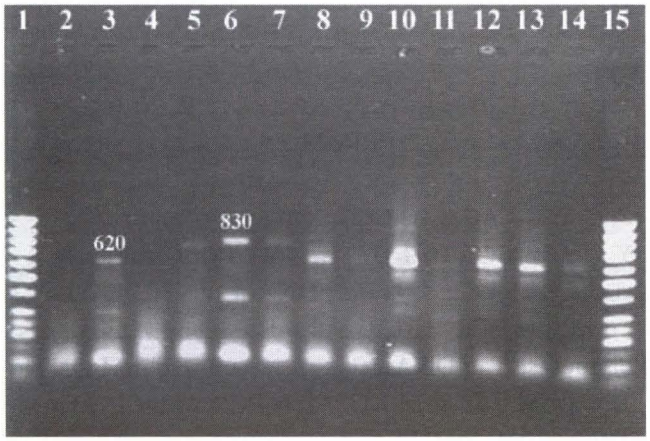
۱) PCR وسیله ای سریع جهت تکثیر شمار بسیار زیادی کپی از مولکول های DNA از روی DNA الگو می باشد. ۲) با استفاده از PCR می توان بیماری لیشمانیوز پوستی را در مراحل ابتدایی تایید نمود که در روش تهیه گسترش این کار امکان پذیر نیست(۷).

فراوانی kDNA (حدوداً ۱۰۰۰۰ DNA حلقوی کوچک) در هر انگل و درجه بالای هتروژنی، مینی سیرکل ها را اهداف مناسبی برای مطالعات تاکسونومیکی، تشخیصی و تمایزی قرار داده است. به همین دلیل ما نیز از kDNA برای تشخیص گونه های مختلف استفاده کردیم(۲و ۷)

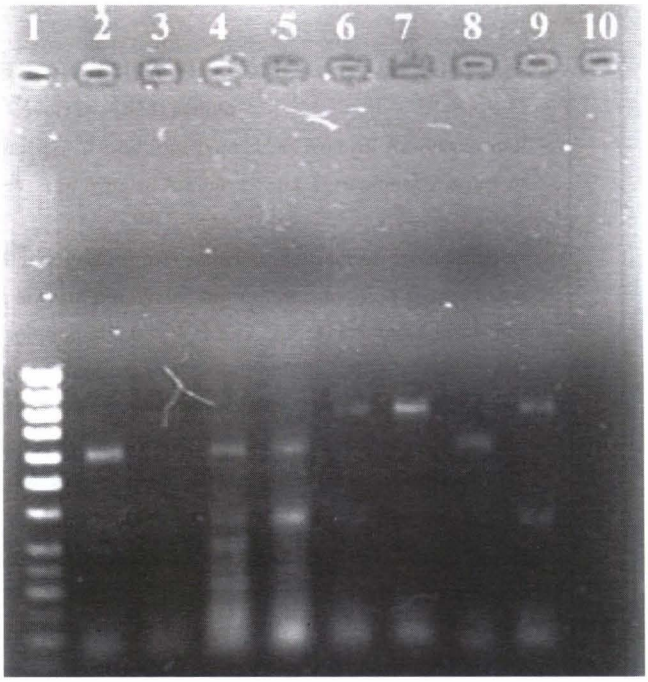
در این کوشش در کنار اهداف اصلی، بازدهی نمونه برداری با کاغذ صافی برای تشخیص لیشمانیوز پوستی ارزیابی شد. عواملی که باعث برتری روش کاغذ صافی در نمونه برداری می شود شامل راحتی انتقال نمونه ها به آزمایشگاه (مخصوصاً در مناطق آندمیکی که امکانات آزمایشگاهی وجود ندارد)، قابلیت نگهداری آسان این نمونه ها (در ۲۰- درجه سانتی گراد به مدت یک سال و در دمای محیط آزمایشگاه به مدت شش ماه)، سادگی نمونه برداری، تسهیل در استخراج DNA، کم هزینه و قابل اطمینان بودن آن می باشد(۶).

سپاسگزاری

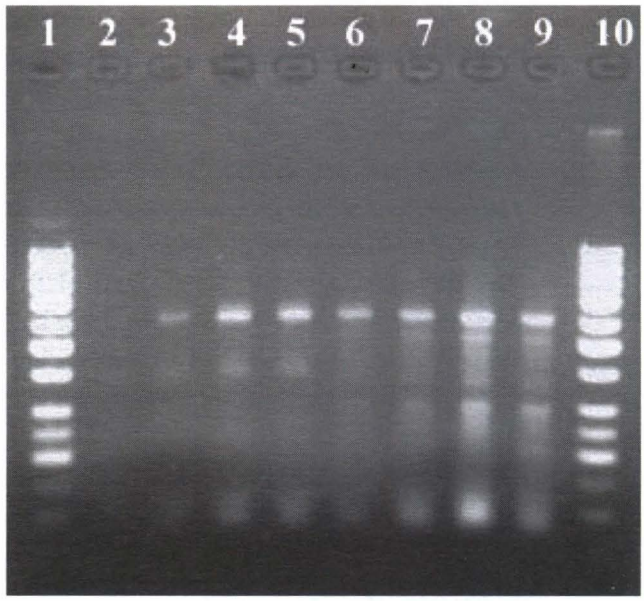
در پایان لازم میدانم از زحمات دکتر شهرام مرادی مدیریت محترم مرکز پوستی سالکی استان اصفهان و جناب آقای مهابادی مسول بخش نمونه گیری بیماران پوستی کمال تشکر را داشته باشم.



شکل۱. الکتروفورز محصول PCR از kDNA استخراج شده از بیمارا ن دارای لیشمانیوز پوستی و غیر لیشمانیوز پوستی. چاهک شماره ۱ و ۱۵ نشانگر DNA kb۱؛ چاهک های شماره ۳، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳ و ۱۴،*L. major*(MRHO /۵۹/P strain)؛ چاهک های شماره ۵، ۶ و۷، *L.tropica*(MHOM /۵۸/OD) و چاهک های شماره ۲ و ۴ مربوط به بیماران بدون لیشمانیوز پوستی



شکل ۲. الکتروفورز محصول PCR از kDNA استخراج شده از بیمارا ن دارای لیشمانیوز پوستی و غیر لیشمانیوز پوستی. چاهک شماره ۱، نشانگر DNA kb۱؛ چاهک شماره ۲، سویه استاندارد (*L. major*(MRHO /۵۹/P strain، چاهک شماره ۷، سویه استاندارد (*L.tropica*(MHOM /۵۸/OD، چاهک‌های شماره ۴، ۵ و ۸ (*L. major*(MRHO /۵۹/P strain، چاهک های ۶، ۷ و ۹ (*L.tropica*(MHOM /۵۸/OD و چاهک های شماره ۳ و ۱۰ مربوط به بیماران بدون لیشمانیوز پوستی



شکل ۳. الکتروفورز محصول PCR از غلظت های مختلف kDNA استخراج شده. چاهک ۱-۸ به ترتیب میزان ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳، ۳/۵ و ۴ میکرولیتر از DNA الگو.

منابع مورد استفاده

۱) جمالی، س. ۱۳۷۷. بررسی کارایی واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR) در تشخیص و تعیین گونه های Leishmania در افراد واکسینه و غیر واکسینه. پایان نامه جهت اخذ دکترای انگل شناسی. دانشگاه علوم پزشکی اصفهان.

2- Cupolillo,E., Momen, H. and Grimaldi, G. 1998. Genetic diversity in natural populations of new world leishmania. Mem Instito Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 93(5): 663-668

3- Eduardo, H., Gomes, R., Mendonc, A., Wayner, V., Edileuza, M. and Frederico G. 2002. Evaluation of PCR for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis in an Area of endemicity in northeastern Brazil. Journal of Clinical Microbiology, 3572–3576

4- Marfurt. J., Nasereddin. A. and Jaffe. C. L. 2003. Identification and differentiation of leishmania species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. Journal of Clinical Microbiology., July 2003, p. 3147–3153

5- Noyes, H., Chance, M., Ponce, C. And Maingon, R. 1997. *Leishmania chagasi*: Genotypically similar parasites from honduras cause both visceral and cutaneous leishmaniasis in humans. Experimental Parasitology, 85, 264–273

6-Kristen, A., Lozano, C., Barker, C. and Santrich, C. 2002. Pcr-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by leishmania. Journal of Clinical Microbiology, 40(2), 601-606

7-Marques. M. J., Volpini, C. and Romanha, A. J. 2001.Simple from of clinical sample preservation and leishmania DNA extraction from human lesions for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis via polymerase chain reaction. American Journal of Medicine Hygiene, 65(6), 902-906

8- Sundar, S. and Rai, M. 2002.Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. American Society for Microbiology, 9, 5, 951–958

9-Bensoussan. E., Nasereddin. A., Jonas. F. 2006. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. Journal of Clinical Microbiology., Apr. p. 1435–1439

10- Schonion, G., Nasereddin, A., Schweynoch, and Presber, H. 2003. PCR diagnosis and characterization of leishmania in local and imported clinical sample. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 47, 349-358

11- Balley, W. and Noyes. A.1998 A nested PCR based schizodeme method for identifying leishmania kinetoplast minicircle classes directly from clinical its application to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. Journal of Clinical Microbiology, 2877–2881.

12-Yaghoobi-Ershadi, M. R., hanafi, Bojd, A. A., Akhavan, A. A., Zahrai, A. R. and Mohebali, M. 2001. Epidemiological study in a new focus of cutaneous leishmaniasis due to leishmania in Ardestan town, central of Iran. Acta Tropica, 79, 115-121