پژوهنده (مجله پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)
سال چهاردهم، شماره ۵، پی در پی ۷۱، صفحات ۲۴۷ تا ۲۵۳
آذر و دی ۱۳۸۸

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۸/۲۶
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۸/۲/۹

بررسی عفونت همزمان انگل لشمانیا ماژور در اسلایدهای پاتولوژیک بیماران مبتلا به گرانولوم سارکوییدی با استفاده از روش PCR

دکتر حمیده مروج‌فرشی [1*]، دکتر پروانه وصال [1]، دکتر بهرام کاظمی [2]، دکتر شیذر ناهیدی [3]، دکتر فریدون مهبودی [4]

۱. دانشیار، مرکز تحقیقات پوست، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۲. استاد، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی ومولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۳. پزشک عمومی، مرکز تحقیقات پوست، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۴. دانشیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران

چکیده

سابقه و هدف: تاکنون عوامل بسیاری در ارتباط با شروع و گسترش بیماری سارکوییدوز مطرح شده‌اند، اما اخیراً شواهدی مبنی بر وجود رابطه این بیماری با لشمانیا مطرح و گزارش شده است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه یک مطالعه مقطعی بوده که به منظور جداسازی گونه‌های شایع لشمانیا از بافت پوستی بیماران مبتلا به گرانولوم سارکوییدی طراحی شده است. بدین منظور، ۲۵ بلوک پارافینه از بیوپسی پوست بیمارانی که قبلاً تشخیص گرانولوم سارکوییدی برای آنها گذاشته شده بود، جمع‌آوری شده و مجدداً توسط یک پاتولوژیست بازخوانی و بررسی شدند. با استفاده از روشهای تشخیصی متعارف ورنگ‌آمیزیهای اختصاصی هیچ گونه عامل عفونی مشخصی در این نمونه‌ها یافت نشد. سپس به دنبال جداسازی DNA و با استفاده از روش PCR نمونه‌ها از جهت وجود kDNA اختصاصی لشمانیا مورد بررسی قرار گرفتند. در این بررسی تکثیر یافتن قطعات ۶۲۰bp نشانگر وجود لشمانیا ماژور و وقطعات ۸۳۰bp حاکی از وجود لشمانیا تروپیکا بودند.

یافته‌ها: پس از انجام آزمایش در ۸ مورد (۳۲٪) از نمونه‌ها، نتایج مطابق با باند رفرانس لشمانیا ماژور بود، درحالی که هیچکدام از نمونه‌ها مطابقتی با لشمانیا تروپیکا نداشتند. سن و جنس ارتباطی با وجود مثبت انگل در نمونه‌ها نداشت ($p<0/4$)

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که وجود انگل لشمانیا در مبتلایان به گرانولوم سارکوییدی شایع باشد. لذا توصیه می‌شود که در تمامی ضایعات بالینی مشابه با سارکوییدوز و ضایعاتی با هیستوپاتولوژی سارکوییدال گرانولوما، تست PCR برای DNA اختصاصی لشمانیا روی نمونه‌های بیوپسی انجام گیرد.

واژگان کلیدی: لشمانیوز جلدی، لشمانیا L Major، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، گرانولومای سارکوییدی، سارکوییدوز

مقدمه

سارکوییدوز یک بیماری سیستمیک است که با تشکیل گرانولوم‌های اپیتلیویید غیر کازئیفیه در بافت‌های مختلف همراه بوده و می‌تواند هریک از ارگان‌های بدن مانند ریه، کبد، غدد لنفاوی، چشم و پوست را درگیر نماید (۱). هرچند تاکنون علت اصلی سارکوییدوز ناشناخته مانده است، ولی گزارشهای متعددی در رابطه با نقش احتمالی یا ابتلای همزمان با میکروارگانیسم‌های متفاوت مثل مایکوباکتریاها (به خصوص مایکوباکتریوم توبرکولوزیس، مایکوباکتریوم‌های آتیپیکال، مایکوباکتریوم لپرا) (۶-۲)، ریکتزیا هلوتیکا (۷)، لشمانیا اینفانتوم (۸) و بروسلا ملیتنسیس (۹) در بروز سارکوییدوز انتشار یافته است.

لشمانیوز پوستی که به وسیله گونه‌های مختلف لشمانیا ایجاد می‌شود، یک بیماری خودمحدودشونده بوده که به ندرت به صورت یک بیماری پیچیده تظاهر می‌کند. هرچند لشمانیوز یک عفونت گسترده در سطح دنیاست ولی حدود ۹۰٪ موارد ابتلا به آن در ۷ کشور جهان از جمله ایران به وقوع می‌پیوندد (۱۰). این بیماری یک بیماری اندمیک در مناطق حاره‌ای و تحت‌حاره‌ای جهان است و در مناطق مختلفی از ایران با بروز بسیار بالا یافت می‌شود (۱۲-۱۱).

*نویسنده مسئول مکاتبات: دکتر حمیده مروج‌فرشی؛ تهران، تجریش، بیمارستان شهدای تجریش، مرکز تحقیقات پوست دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی؛ پست الکترونیک: hamideh_moravvej@yahoo.com

امروزه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase chain Reaction: PCR) به عنوان یک تست سریع، حساس و اختصاصی برای ردیابی بسیاری از میکروارگانیسم‌ها از جمله لشمانیا مورد استفاده وسیع قرار می‌گیرد (۱۳). هدف این مطالعه، کشف احتمالی انگل لشمانیا به عنوان عامل اتیولوژیک سارکوییدوز و یا همراهی لشمانیوز و سارکوییدوز با استفاده از تکنیک PCR در مراجعین به مرکز تحقیقات پوست دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و بیمارستان شهدای تجریش، از دی ماه تا فروردین ماه ۱۳۸۴، که به عنوان سارکوییدوز پوستی تشخیص داده شده‌اند، بود. به علاوه امکان کشف یک تابلوی بالینی جدید (و البته ناشایع) از لشمانیا که می‌تواند تصویر بالینی سارکوییدوز را تقلید نماید، فراهم می‌شود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها

تحقیق به روش توصیفی انجام گرفت. تعداد ۲۵ بلوک پارافینه از بیوپسی‌های پوست بیماران مبتلا به گرانولوم سارکوییدی که برای آنها تشخیص بالینی سارکوییدوز پوستی گذاشته شده بود، گردآوری شدند. ابتدا این نمونه‌ها با استفاده از روشهای تشخیصی متداول شامل رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین- ائوزین (H&E)، گیمسا، Periodic Acid Schiff (PAS)، زیل نیلسن از لحاظ وجود انگل لشمانیا، قارچها ومایکوباکتریاها مورد بررسی قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها به وسیله پاتولوژیست دوم مورد بازبینی قرار گرفتند که تشخیص گرانولوم سارکوییدی در تمامی نمونه‌ها تایید شد. گرانولوم سارکوییدی به صورت ذیل تعریف می‌گردد: جزایری کاملاً مشخص از سلولهای اپیتلیوییدی که محتوی معدودی سلولهای ژئانت بوده و انفیلتراسیون پراکنده لمفوسیت‌ها در حاشیه این گرانولوم‌های اپیتلیوییدی قرار دارند (گرانولوم برهنه یا Nacked granuloma).

برای بررسی وجود لشمانیا در نمونه‌های فوق‌الذکر از PCR استفاده شد. این تست در مرکزتحقیقات سلولی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام گردید و در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران تکرار شد و نتایج تایید شدند.

ایزولاسیون DNA از بافت‌های پارافینه

استخراج DNA از بلوک‌های پارافینه بر اساس دستور استفاده کیت‌های شرکت سیناژن انجام گردید. بافت‌های پارافینه به وسیله میکروتوم برش داده شدند و قبل و بعد از برش هر نمونه، تیغه میکروتوم و سایر وسایل به وسیله بنزن و اسیدکلریدریک شسته شده و با آب مقطر آبکشی و سپس به وسیله اتوکلاو استریل می‌شدند. برای حذف پارافین، برش پارافینه یک شب در گزیلن قرار داده شد و سپس سانتریفیوژ شد و دو دفعه نیز با آب مقطر شستشو گردید. نمونه به مدت ۲ ساعت تا یک شبانه‌روز در بافر لیزکننده (۱۰۰ mM sucrose، ۲۵ mM Tris، ۵ mM $MgCl_2$، ۲٪SDS، ۱٪ Triton-X100) در حرارت ۳۷ درجه انکوبه شد. واکنش مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد و مدت ۱۰ دقیقه با ۸۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد، مایع رویی که حاوی DNA بود برای انجام واکنش PCR استفاده شد.

تست PCR با استفاده از کیت‌های اختصاصی تشخیص مولکولی شرکت سیناژن (Leishmania sp. PCR Determination and Detection, CinnaGen, Tehran, Iran) بر روی فرآورده‌های استخراج‌شده DNA انجام شد. پرایمرهای مورد استفاده، اختصاصی کینتوپلاست لشمانیا می‌باشند.

upstream 5' TCGCAGAACGCCCCTACC 3'
downstream 5'-AGGGGTTGGTGTAAAATAGGC 3'

واکنش PCR شامل ۲ میکرولیتر DNA (۱۰۰ نانوگرم)، ۱۵۰ نانومولار dNTP، ۴۰ پیکومول از هریک از پرایمرهای Forward و Reverse، ۱/۵میلی‌مولار $MgCl_2$، ۳ میکرولیتر بافر PCR و ۱/۲۵ واحد انزیم Taq DNA polymerase بود. واکنش در حجم ۳۰ میکرولیتر انجام گرفت. پارامترهای PCR عبارت بودند از Denaturing در ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، Annealing در دمای ۶۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و Extension در دمای ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه. این مراحل ۳۰ بار تکرار شدند. قبل ازاین مراحل، واکنش مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه و بعد از اتمام سیکل‌های PCR نیز ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه قرار داده شد (۱۴).

الکتروفورز محصولPCR:

جهت تایید انجام PCR و اطمینان ازتکثیر قطعه DNA هدف، محصول PCR روی ژل اگارز ۱٪ الکتروفورز شد (۱۵) و نوار DNA مربوط به آن بعد از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم‌بروماید با دستگاه UV Transilluminator مشاهده شد.

این متد تشخیصی یک روش پیشرفته PCR است که DNA میتوکندریال (kDNA) انگل را به عنوان هدف ردیابی می‌کند. با استفاده از این کیت می‌توان گونه لشمانیا را بر اساس سایز محصول PCR مشخص و تعیین نمود. به این ترتیب که قطعه ۶۲۰bp نشانگر لشمانیا ماژور و قطعه ۸۳۰ bp حاکی از وجود لشمانیا تروپیکا بودند.

شیوع آلودگی انگل لشمانیا ماژور در نمونه‌ها تعیین و میزان واقعی آن در جامعه برآورد گردید. نقش سن و جنس با وجود انگل در نمونه‌ها مورد قضاوت آماری قرار گرفت.

یافته‌ها

از ۲۵ نمونه بلوک پارافینه مورد مطالعه ما، ۱۴ نمونه متعلق به مردان و ۱۱ نمونه متعلق به زنان بود. میانگین سنی بیمارانی که مورد بیوپسی قرار گرفتند ۳۷/۵ و محدوده سنی آنها بین ۷ تا ۶۵ سال بود. تمامی نمونه‌ها از ضایعات پوستی بیماران با تظاهرات بالینی سارکوییدوز انتخاب شده بودند. خصوصیات جنس و سن، محل ضایعه و بررسی‌های PCR نشان می‌دهدکه نتیجه در ۱۷ مورد (۶۸٪) منفی ودر ۸ مورد (۳۲٪) مثبت بوده است. با توجه به این شیوع در نمونه‌ها، میزان واقعی آن با احتمال ۹۵ درصد از حداقل ۱۴ تا ۵۰ درصد برآورد می‌شود.

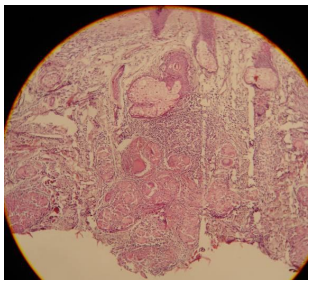
یکی از بیماران مبتلا به دیابت نوع ۱ با درگیری پوستی و ریوی، تظاهرات سیستمیک سارکوییدوز را نشان می‌داد (شکل ۱). تمامی این افراد تست مانتو منفی داشته و در نمای بافت‌شناسی (در بررسی با میکروسکوپ نوری) دارای گرانولوم‌های سارکوییدی بودند (شکل ۲). همچنین سایر تشخیص‌های افتراقی درآنها رد شده بود. نکروز کازئوز در هیچ یک از ضایعات وجود نداشت ولی در یکی از نمونه‌ها نکروز فیبرینوئید مشاهده شد. در ۵ نمونه، یک شبکه ظریف رتیکولومی گرانولوم‌ها را احاطه کرده بود. در رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی گیمسا، PAS و زیل‌نیلسن برای عفونت‌های لشمانیایی، قارچی و مایکوباکتریومی، هیچ گونه میکروارگانیسمی یافت نگردید. همچنین شواهدی دال بر وجود شکل آماستیگوت لشمانیا در رنگ‌آمیزی H&E وجود نداشت.

تست PCR بر روی تمامی بافت‌های پارافینه انجام شد. در ۸ نمونه باند تقویت یافته ۶۲۰bp که حاکی از وجود DNA لشمانیا ماژور بود، رؤیت شد که در شکل ۳، تعداد سه نمونه از نتایج به‌دست‌آمده نمایش داده شده‌اند. همچنین نتایج PCR انجام‌شده بر روی نمونه پوست و نیز لاواژ برونکیال بیمار مبتلا به درگیری سیستمیک، به ترتیب در شکل‌های ۴ و ۵ مشاهده می‌شوند.

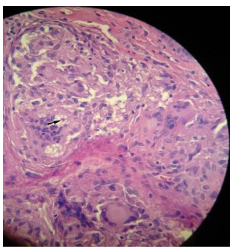
بین سن و جنس بیماران با وجود انگل ارتباطی وجود نداشت ($p<۰/۴$).

شکل ۱- بیمار دیابتیک با ضایعات پوستی سارکوییدوز باگرفتاری ریوی

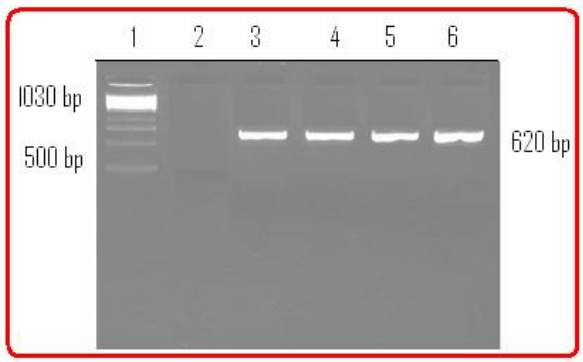
A



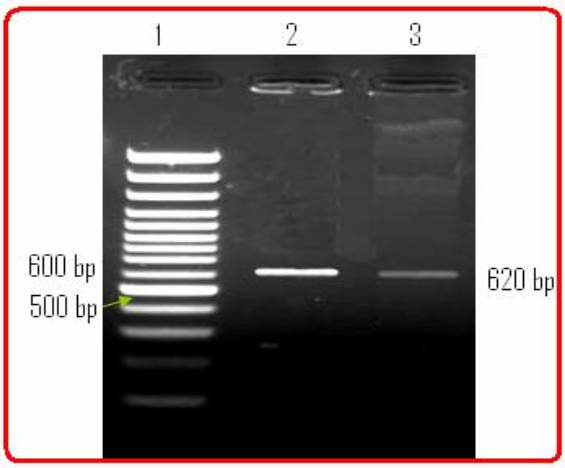
:B



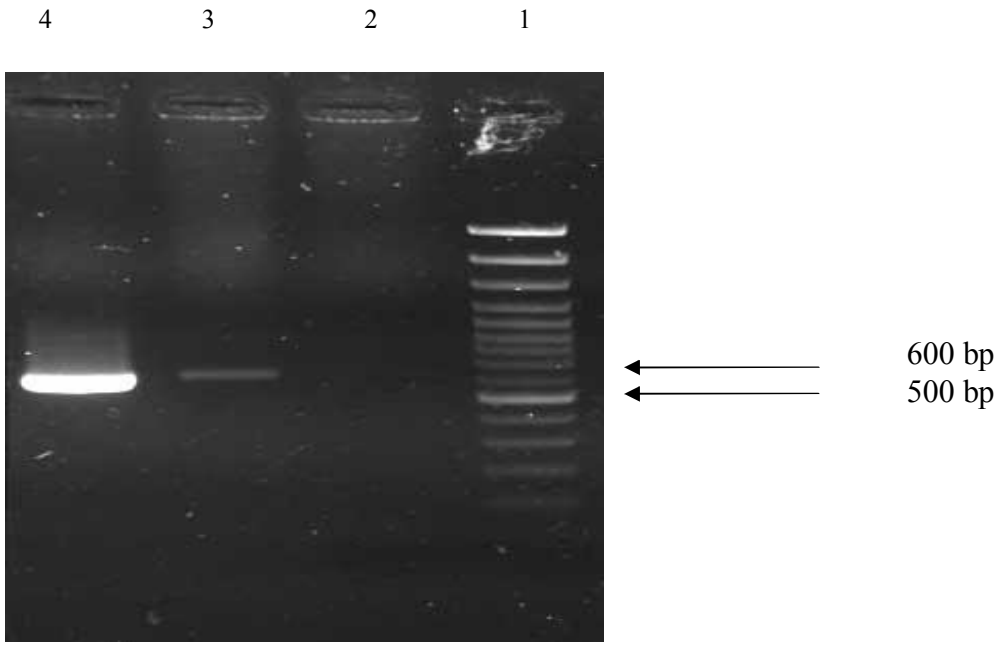
شکل ۲- A: گرانولوم سارکوییدی شامل جزایری از سلولهای اپیتلیویید با تعداد معدودی سلول ژائنت و مقادیر بسیار کمی از سلولهای لمفوسیت در حاشیه این جزایر(رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین –ائوزین، بزرگنمایی اولیه×۴) B: یک جسم ستاره‌ای شکل (asteroid body) در یک سلول ژائنت چندهسته‌ای مشاهده می‌شود (بزرگنمایی اولیه×۴۰)



شکل ۳- نتایج به دست آمده از محصول PCR از سه نمونه پوست بیماران. ستون ۱: مارکر وزنی DNA؛ ستون ۲: کنترل منفی؛ ستون۳: کنترل مثبت و ستونهای ۴ تا ۶: محصول PCR نمونه‌های بیماران



شکل۴- نتایج PCR انجام شده برروی نمونه پوست بیمار مبتلا به درگیری پوستی و ریوی
ستون ۱: مارکر وزنی DNA. ستون‌های ۲و۳: محصول PCR از نمونه پوست



شکل ۵- نتایج PCR به دست آمده از لاواژ برونکیال بیمار مبتلا به درگیری ریوی (ستون ۱: مارکر وزنی DNA، ستون ۲: کنترل منفی، ستون۳: محصول PCR نمونه بیمار و ستون ۴:کنترل مثبت)

بحث

تحقیق نشان داد که انگل لشمانیا ماژور در ۳۲٪ مبتلایان به گرانولوم سارکوییدی وجود داشت. از آنجا که ضایعات گرانولومی یافت‌شده در سارکوییدوز در بسیاری از بیماریهای دیگر از جمله بدخیمیها، واکنشهای افزایش حساسیت، واکنش به جسم خارجی و از همه مهمتر بیماریهای عفونی نیز یافت می‌شوند، تشخیص سارکوییدوز، بر اساس رد سایر علل است (۱۶). امروزه با ارایه روشهای مدرن میکروبیولوژی مشخص گردیده که بسیاری از مواردی که قبلاً به عنوان سارکوییدوز شناخته می‌شدند، ناشی از عفونت همزمان یا نتیجه یک عفونت نهفته بودند (۹-۲). هرچند این همزمانی در مورد لشمانیا بسیار به ندرت گزارش شده است (۱۸-۱۷ و ۸).

از بین تمامی اشکال بالینی لشمانیوز پوستی، انواع مزمن آن هم در تشخیص بالینی و هم در افتراق هیستولوژیک از دیگر بیماریهای مشابه از قبیل لپر توبرکولویید، لوپوس ولگاریس، روزاسه لوپویید و گرانولوم آنولر، پزشکان را با مشکل مواجه می‌کند. دربرخی مطالعات، ضایعات آتیپیک منفرد یا متعدد ندولر پوستی گزارش شده‌اند که گونه لشمانیا در تعداد قابل‌توجهی از آنها به دست آمده است (۱۹-۱۸). از لحاظ بافتی این ضایعات گرانولومی که تحت عنوان گرانولوم‌های برهنه یا گرانولوم‌های سارکوییدی شناخته می‌شوند،

ازگرانولوم‌های توبرکولویید که در فرم‌های کلاسیک لشمانیوز پوستی دیده می‌شوند کاملاً متفاوت است. به عبارت دیگر این گرانولوم‌ها را به صورت معمول نمی‌توان ناشی از وجود یک عامل عفونی دانست. یافتن میکروارگانیسم در این ضایعات بسیار مشکل و یا غیرممکن است. تاکنون این تصویر بالینی با گونه‌های متفاوتی از لشمانیا گزارش شده است (۲۰-۱۸). در حقیقت، این امکان وجود دارد که بسیاری از پزشکان سهواً این شکل ناشایع لشمانیا را به خصوص زمانی که فرم آماستیگوت لشمانیا یافت نشود، تحت عنوان سارکوییدوز تشخیص دهند. به علاوه درمان این فرم بالینی بیماری که مقلد بیماریهای دیگری نیز می‌باشد، ممکن است در تضاد با درمان بیماریهای مشابه آن (مثل سارکوییدوز) باشد. درحقیقت، تشخیص اشتباه پزشکان ممکن است سبب به مخاطره انداختن بیمار شود. لشمانیازیس یک عفونت فرصت‌طلب در افراد دارای ایمنی سرکوب‌شده است. قبلاً گزارشهایی در مورد وقوع لشمانیوز پوستی و مخاطی در بیماران دچار سل ریوی و بیماران تحت پیوند منتشر شده است (۸). بر اساس مطالعات قبلی در زمینه لشمانیوز پوستی در انسان، مشخص گردیده که کنترل و محدود کردن عفونت لشمانیا بیشتر با مکانسیم ایمنی سلولی مرتبط با لمفوسیت‌های T به خصوص سلولهای Th1 انجام می‌شود (۲۱). بنابراین، بروز لشمانیوز پوستی در بیماران دارای نقص ایمنی ممکن است مرتبط با پاسخ ناکافی ایمنی سلولی آنها باشد. دراین مطالعه متوتروکسات که یک داروی ایمونوساپرسیو با تمایل بیشتر در مهار ایمنی سلولی است در دو بیمار مورد استفاده قرار گرفته بود که البته این دو بیمار مبتلا به فرم منتشر ضایعات بودند. جالب آن که مداخلات تشخیصی بیشتر درگیری ریوی را در یکی از دو بیمار اخیر نشان داد (شکل ۱). در مجموع، این وقایع بیشتر مؤید این تئوری است که بروز لشمانیوز پوستی (به خصوص فرم منتشر آن) به احتمال قوی مربوط به تأثیرات ایمنوساپرسیو متوتروکسات بوده باشد و در اثر خود بیماری سارکوییدوز ایجاد نشده است. علاوه بر این، نکته مورد توجه این بود که تمامی ارگانیسم‌های جداشده از نمونه‌های بیماران (حتی موارد منتشر) مربوط به گونه لشمانیا ماژور بودند که تاکنون در رابطه با این گونه لشمانیا گزارش نشده است.

تکنیک PCR از ابتدای ظهور، به عنوان یکی از دقیقترین روشها برای یافتن طیف وسیعی از عوامل آنتی‌ژنیک از جمله عوامل عفونی شناخته شده است. صفایی و همکاران، در طی مطالعه خود بر روی ضایعات التهابی گرانولومی، حساسیت تست PCR را برای یافتن لشمانیا در بیمارانی که واجد شواهد بافتی مثبت بودند، ۹۲٪ و اختصاصی بودن آن را ۱۰۰٪ تعیین نمودند. در یک پژوهش، در ۲۹ بیماری که مطالعات بافت‌شناسی آنها برای یافتن آماستیگوت منفی بود، تست PCR در ۲۴ نمونه مثبت شد. لذا این نتیجه به دست آمد که حساسیت این تست در شرایط فوق‌الذکر (یعنی منفی بودن آزمایشهای بافت‌شناسی) به ۸۲/۷٪ تقلیل می‌یابد (۱۳). در هر حال، در مقایسه با سایر متدهای تشخیصی، PCR دارای بیشترین مقدار حساسیت می‌باشد و فاصله این مقدار در شرایط مزمن نسبت به روشهای دیگر تشخیصی بیشتر نیز می‌شود (۲۲). دلیل ما برای استفاده از تست kDNA PCR حساسیت بیشتر این تست در مقایسه با روشهای دیگر PCR مانند Internal transcribed spacer 1 PCR (ITS1 PCR) و splice leader mini-exon PCR (SLME PCR). است که در این رابطه وجود دارند.

به علاوه، مشخص شده که درشرایطی که حجم پارازیت در نمونه بافتی کم باشد، این تکنیک از کارآیی و فایده بیشتری برخوردار است و این به خاطر آن است که شاخص تعداد مینی‌سیرکل در واحد پارازیتی (per parasite minicircle) در این گونه انگل بالا است (۲۳).

بر اساس مطالعات متعدد، به طور عمده دو گونه لشمانیا (لشمانیا ماژور و لشمانیا تروپیکا) در کشور ما وجود دارد که مسؤول بیش از ۹۰٪ موارد لشمانیوز پوستی است (۲۶-۲۴). لذا دلیل این که نمونه‌های ما برای وجود این دو گونه لشمانیا مورد بررسی قرار گرفت، اندمیسیته، توزیع جغرافیایی و سیمای اپیدمیولوژیک آنها بوده است. لشمانیا اینفانتوم نیز که به عنوان یک لشمانیای دنیای قدیم شناخته می‌شود - هرچند به ندرت- ولی در کشور ما گزارش شده است (۲۶). بنابراین بررسی نمونه‌های مورد مطالعه ما از لحاظ وجود این گونه انگلی به موازات دو گونه شایع دیگر، جامعیت نتایج ما را می‌افزود. با این حال، ما در این مطالعه تنها ۲۵ مورد از بیماران مبتلا به گرانولوم سارکوییدال را مورد بررسی قرار دادیم که در نتیجه مطالعه ما به عنوان یک مطالعه اولیه قابل گزارش می‌باشد. اما با توجه به این که لشمانیا در ایران اندمیک است، پیشنهاد می‌شود مطالعات وسیعتر، با حجم نمونه بالاتر انجام گیرد.

نتیجه‌گیری

پیشنهاد می‌شود که در مناطق اندمیک برای تمامی ضایعات گرانولومی پوستی که مطابقت با گرانولوم سارکوییدی دارند، از روش PCR برای ردیابی وجود DNA اختصاصی لشمانیا

استفاده شود و سپس با تست لشمانین و نتایج اندازه‌گیری آنتی‌بادی‌های سرمی مربوط به L tropica، L infantum و L major مطابقت داده شود تا ارتباط گرانولوم سارکوییدی (naked granuloma) بیشتر روشن گردد.

REFERENCES

1. Braverman IM. Sarcoidosis. Fitzpatrick's dermatology in general medicine.6th ed. New York, NY: McGraw-Hill;2003:1777.

2. Li N, Bajoghli A, Kubba A, Bhawan J. Identification of mycobacterial DNA in cutaneous lesions of sarcoidosis. J Cutan Pathol 1999;26 271-8.

3. Almenoff PL, Johnson A, Lesser M, Mattman LH. Growth of acid fast L forms from the blood of patients with sarcoidosis. Thorax 1996;57:530-3.

4. Ikonomopoulos JA, Gorgoulis VG, Zacharatos PV, Manolis EN, Kanavaros P, Rassidakis A, et al. Multiplex polymerase chain reaction for the detection of mycobacterial DNA in cases of tuberculosis and sarcoidosis. Mod Pathol 1999;12(9):854-62.

5. Burdick AE, Hendi A, Elgart GW, Barquin L, Scollard DM. Hansen's disease in patient with a history of sarcoidosis. J Lepr Other Mycobact Dis 2000;68(3):307-11.

6. Osaki M, Adachi H, Gomyo Y, Yoshida H, Ito H. Detection of mycobacterial DNA in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens by duplex polymerase chain reaction: application to histopathologic diagnosis. Mod Pathol. 1997; 10(1):78-83.

7. Nilsson K, Pahlson C, Lukinius A, Eriksson L, Nilsson L, Lindquist O. Presence of Rickettsia helvetica in granulomatous tissue from patients with sarcoidosis. J Infect Dis 2002;185(8):1128-38.

8. Wermert D, Lamblin C, Wallaert B, Marty P, Leroy C. Pulmonary sarcoidosis with cutaneous leishmaniasis. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis 1999;16(2):228-9.

9. Pila-Perez R, Pila-Pelaez R, Paulino-Basulto M, Del-Sol-Sosa JM. Sarcoidosis and brucellosis: a strange and infrequent association. Gac Med Mex 2003;139(2):160-4. [Article in Spanish]

10. Ashford RW, Desjeux P, De Raadt P. Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis. Parasitol Today 1992;8:104-5.

11. Desjeux P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. Clin Dermatol 1996;14(5):417-23.

12. Dowlati Y. Cutaneous leishmaniasis: clinical aspect. Clin Dermatol 1996;14(5):425-31.

13. Safaei, A., Motazedian M.H., Vasei M. Polymerase Chain Reaction for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis in Histologically Positive, Suspicious and Negative Skin Biopsies. Dermatology 2002; 205: 18-24.

14. Pherson Mc, Moller MJ. PCR, The Basics from Background to Bench. In: Undrestanding PCR. Bios Scientific publishers; 2000. p. 9-21

15. Boffey SA. Agarose gel electrophoresis of DNA. In: Walker JM, editor. Nucleic Acids, Humana Press; pp 43-50. (Methods in Molecular Biology; vol 2)

16. Weissler JC. Southwestern internal medicine conference: Sarcoidosis: Immunology and clinical management. Am J Med Sci.1994;307(3):233-45.

17. Hill PA14-. A case of granulomatous dermatitis: cutaneous leishmaniasis. Pathology 1997;29(4):434-6.

18. Boer A, Blodorn-Schlicht N, Wiebels D, Steinkraus V, Falk TM.15- Unusual histopathological features of cutaneous leishmaniasis identified by polymerase chain reaction specific for Leishmania on paraffin-embedded skin biopsies. Br J Dermatol 2006;155(4):815-9.

19. Convit J, Ulrich M, Peres M, Hung J, Castillo J, Rojas H, et al. Atypical cutaneous leishmaniasis in Central America: possible interaction between infectious and environmental elements. Trans R Soc Trop Med Hyg 2005;99(1):13-7.

20. Momeni AZ, Yotsumoto S,Mehregan DR, Mehregan AH, Mehregan DA, Aminjavaheri M, Fujiwara H, Tada J. Chronic lupoid leishmaniasis. Evaluation by polymerase chain reaction. Arch Dermatol. 1996 Feb;132(2):198-202.

21. Farrell JP, Muller I, Louis JA. A role for Lyt-2+ T cells in resistance to cutaneous leishmaniasis in immunized mice. J Immunol. 1989 Mar 15;142(6):2052-6.

22. Weigle KA, Labrada LA, Lozano C, Santrich C, Barker DC. 19- PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania (Viannia). J Clin Microbiol. 2002;40(2):601-6.

23. Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL. 20-Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. J Clin Microbiol 2006;44(4):1435-9.

24. Motazedian H, Noamanpoor B, Ardehali S. Characterization of Leishmania parasites isolated from provinces of the Islamic Republic of Iran. East Mediterr Health J 2002;8(2-3):338-44.

25. Nadim A, Seyedi-Rashti MA. A brief review of the epidemiology of various types of leishmaniasis in Iran. Acta Med Iran 1971;14:99-106.

26. Hajjaran H, Mohebali M, Razavi MR, Rezaei S, Kazemi B, Edrissian GhH, et al. Identification of Leishmania Species Isolated from Human Cutaneous Leishmaniasis, using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR). Iran J Public Health 2004;33(4):8-15.