

بررسی عفونت همزمان انگل لشمانیا ماژور در اسلایدهای پاتولوژیک بیماران

مبتلا به گرانولوم سارکوئیدی با استفاده از روش PCR

دکتر حمیده مروج‌فرشی^{۱*}، دکتر پروانه وصال^۱، دکتر بهرام کاظمی^۲، دکتر شیخز نامیدی^۳، دکتر فریدون مهبودی^۴

۱. دانشیار، مرکز تحقیقات پوست، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۲. استاد، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، 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 سارکوئیدوز 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 سارکوئیدی طراحی شده است. بدین منظور، ۲۵ بلوک پارافینه از بیوپسی پوست بیمارانی که قبلاً تشخیص گرانولوم سارکوئیدی برای آنها گذاشته شده بود، جمع‌آوری شده و مجدداً توسط یک پاتولوژیست بازخوانی و بررسی شدند. با استفاده از روشهای تشخیصی متعارف و رنگ‌آمیزیهای 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 ۶۲۰ bp نشانگر وجود لشمانیا ماژور و قطعات ۸۳۰ bp حاکی از وجود لشمانیا تروپیکا بودند.

یافته‌ها: پس از انجام آزمایش در ۸ مورد (۳۲٪) از نمونه‌ها، نتایج مطابق با باند فرانس 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 سارکوئیدی شایع باشد. لذا توصیه می‌شود که در تمامی ضایعات بالینی مشابه با سارکوئیدوز و ضایعاتی با هیستوپاتولوژی سارکوئیدال گرانولوما، تست PCR برای DNA اختصاصی لشمانیا روی نمونه‌های بیوپسی انجام گیرد.

واژگان کلیدی: لشمانیوز جلدی، لشمانیا Major، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، گرانولوما سارکوئیدی، سارکوئیدوز

مقدمه

آتیبیکال، مایکوباکتریوم لپرا (۶-۲)، ریکتزیا هلوتیکا (۷)، لشمانیا اینفانتوم (۸) و بروسلا ملیتنسیس (۹) در بروز سارکوئیدوز 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 (۱۱-۱۲).

سارکوئیدوز یک بیماری سیستمیک است که با تشکیل گرانولوم‌های اپیتلیوئید غیر کازئیفیه در بافت‌های مختلف همراه بوده و می‌تواند هر یک از ارگان‌های بدن مانند ریه، کبد، غدد لنفاوی، چشم و پوست را درگیر نماید (۱). هرچند تاکنون علت اصلی سارکوئیدوز ناشناخته مانده است، ولی گزارشهای متعددی در رابطه با نقش احتمالی یا ابتلای همزمان با میکروارگانیسم‌های متفاوت مثل مایکوباکتریایا (به خصوص مایکوباکتریوم توبرکولوزیس، مایکوباکتریوم‌های

* 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

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 گزین 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 MgCl₂، 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 لیشمانیا می‌باشند.

upstream 5' TCGCAGAACGCCCTACC 3'
downstream 5'-AGGGGTTGGTGTAATAATAGGC 3'
واکنش PCR شامل ۲ میکرولیتر DNA (۱۰۰ نانوگرم)، ۱۵۰ نانومولار dNTP، ۴۰ پیکومول از هر یک از پرایمرهای Forward و Reverse، ۱/۵ میلی‌مولار MgCl₂، 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 از این 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 محصول PCR:

جهت تایید انجام PCR و اطمینان از تکثیر قطعه DNA هدف، محصول PCR روی ژل اگارز ۱٪ الکتروفورز شد (۱۵) و نوار DNA مربوط به آن بعد از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید 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 لیشمانیا را بر اساس سایز محصول PCR مشخص و تعیین نمود. به این ترتیب که قطعه ۶۲۰ bp نشانگر لیشمانیا ماژور و قطعه ۸۳۰ bp حاکی از وجود لیشمانیا تروپیکا بودند.

امروزه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Polymerase chain Reaction: PCR) به عنوان یک تست سریع، حساس و اختصاصی برای ردیابی بسیاری از میکروارگانیسم‌ها از جمله لیشمانیا مورد استفاده وسیع قرار می‌گیرد (۱۳). هدف این مطالعه، کشف احتمالی انگل لیشمانیا به عنوان عامل اتیولوژیک سارکوییدوز و یا همراهی لیشمانیوز 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 لیشمانیا 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-ئوزین (H&E)، گیمسا، Periodic Acid Schiff (PAS)، زیل نیلسن از لحاظ وجود انگل لیشمانیا، قارچها و میکوباکتریها 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 اپیتلیویدی که محتوی معدودی سلولهای ژنانت بوده و انفیلتراسیون پراکنده لمفوسیت‌ها در حاشیه این گرانولوم‌های اپیتلیویدی قرار دارند (گرانولوم برهنه یا Naked granuloma).

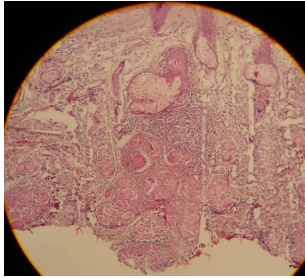
برای بررسی وجود لیشمانیا در نمونه‌های فوق‌الذکر از PCR استفاده شد. این تست در مرکز تحقیقات سلولی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام گردید و در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران تکرار شد و نتایج تایید شدند.

ایزولاسیون DNA از بافت‌های پارافینه

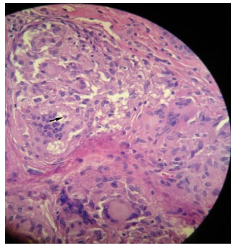
استخراج DNA از بلوک‌های پارافینه بر اساس دستور استفاده کیت‌های شرکت سیناژن انجام گردید. بافت‌های پارافینه به وسیله میکروتوم برش داده شدند و قبل و بعد از برش هر



شکل ۱- بیمار دیابتیک با ضایعات پوستی سارکوئیدوز باگرفتاری ریوی

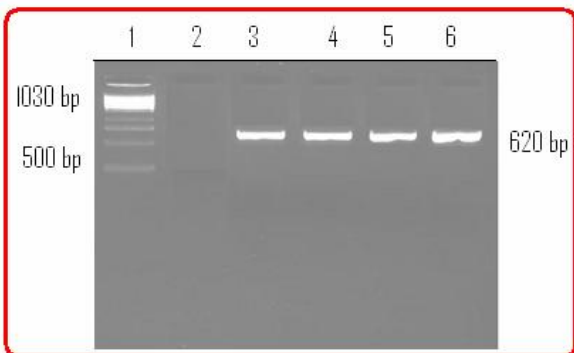


A



B:

شکل ۲- A: گرانولوم سارکوئیدی شامل جزایری از سلولهای اپیتلیوئید با تعداد معدودی سلول ژئانت و مقادیر بسیار کمی از سلولهای لمفوسیت در حاشیه این جزایر (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین، بزرگنمایی اولیه $\times 4$) B: یک جسم ستاره‌ای شکل (asteroid body) در یک سلول ژئانت چند هسته‌ای مشاهده می‌شود (بزرگنمایی اولیه $\times 40$)



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

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.

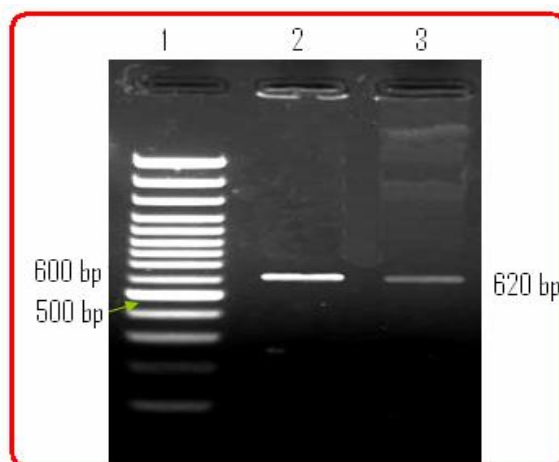
یافته‌ها

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 $37/5$ و محدوده سنی آنها بین ۷ تا ۶۵ سال بود. تمامی نمونه‌ها از ضایعات پوستی بیماران با تظاهرات بالینی سارکوئیدوز انتخاب شده بودند. خصوصیات جنس و سن، محل ضایعه و بررسی‌های PCR نشان می‌دهد که نتیجه در ۱۷ مورد (68%) منفی و در ۸ مورد (32%) 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.

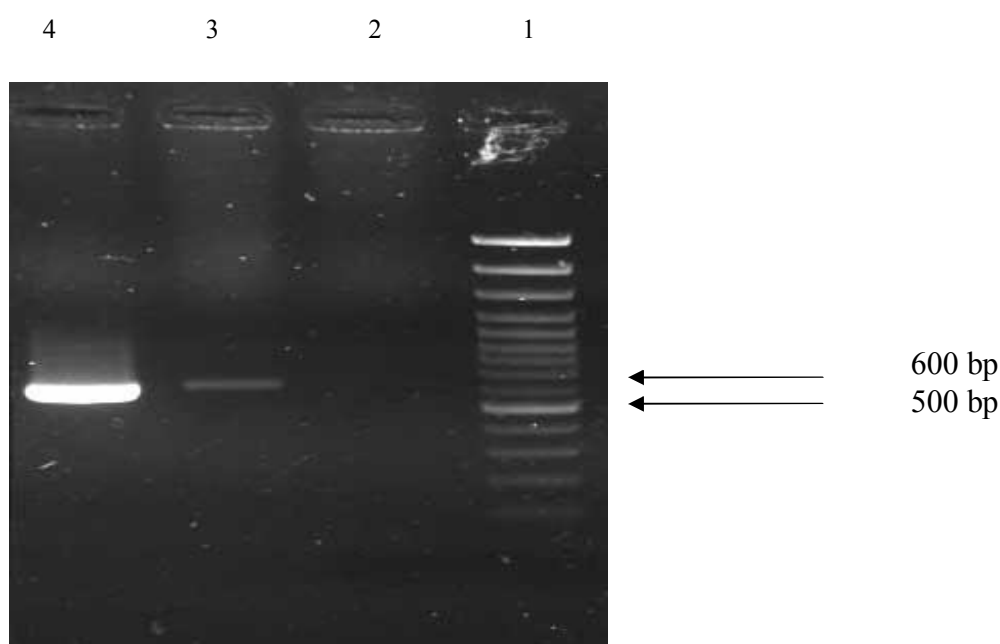
یکی از بیماران مبتلا به دیابت نوع ۱ با درگیری پوستی و ریوی، تظاهرات سیستمیک سارکوئیدوز را نشان می‌داد (شکل ۱). تمامی این افراد تست مانتو منفی داشته و در نمای بافت‌شناسی (در بررسی با میکروسکوپ نوری) دارای گرانولوم‌های سارکوئیدی بودند (شکل ۲). همچنین سایر تشخیص‌های افتراقی در آنها رد شده بود. نکروز کازئوز 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 میکروارگانیزمی 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 620 bp 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 ($p < 0/4$).



شکل ۴- نتایج PCR انجام شده بر روی نمونه پوست بیمار مبتلا به درگیری پوستی و ریوی
ستون ۱: مارکر وزنی DNA. ستون‌های ۲ و ۳: 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،
ستون ۳: محصول PCR نمونه بیمار و ستون ۴: کنترل مثبت)

بحث

تحقیق نشان داد که انگل لیشمانیا ماژور در ۳۲٪ مبتلایان به گرانولوم سارکوئیدی وجود داشت. از آنجا که ضایعات گرانولومی یافت شده در سارکوئیدوز در بسیاری از بیماریهای دیگر از جمله بدخیمیه، واکنشهای افزایش حساسیت، واکنش به جسم خارجی و از همه مهمتر بیماریهای عفونی نیز یافت می‌شوند، تشخیص سارکوئیدوز، بر اساس رد سایر علل است (۱۶). امروزه با ارایه روشهای مدرن میکروبیولوژی مشخص گردیده که بسیاری از مواردی که قبلاً به عنوان سارکوئیدوز شناخته می‌شدند، ناشی از عفونت همزمان یا نتیجه یک

عفونت نهفته بودند (۹-۲). هرچند این همزمانی در مورد لیشمانیا بسیار به ندرت گزارش شده است (۱۷-۱۸ و ۸). از بین تمامی اشکال بالینی لیشمانیوز 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. در برخی مطالعات، ضایعات آتیپیک منفرد یا متعدد ندولر پوستی گزارش شده‌اند که گونه لیشمانیا در تعداد قابل توجهی از آنها به دست آمده است (۱۹-۱۸). از لحاظ بافتی این ضایعات گرانولومی که تحت عنوان گرانولوم‌های برهنه یا گرانولوم‌های سارکوئیدی شناخته می‌شوند،

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٪ 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 در شرایطی که حجم پارازیت در نمونه بافتی کم باشد، این تکنیک از کارایی 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 (۲۴-۲۶). 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

از گرانولوم‌های توپرکولویید 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 میکروارگانیزم 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. در حقیقت، 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. در این 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 ایمونوساپرسیو متوتروکسات بوده باشد و در اثر خود بیماری سارکوییدوز ایجاد نشده است. علاوه بر این، نکته مورد توجه این بود که تمامی ارگانیزم‌های جدا شده 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

استفاده شود و سپس با تست لشمینین 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. Ikononopoulos 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: Understanding 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.