Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:59 +0330 on Thursday February 22nd 2018

BRIEF REPORT

Molecular Identification of Leishmania Species Isolated from Patients with Cutaneous Leishmaniasis in Pakdasht District, Iran, 2009-2014

Hossein Pazoki Ghohe[1],
Abdol Sattar Pagheh[2],
Mahdi Fakhar[3],
Ghafour Tavakoli[4],
Eisa Nazar[5],
Maryam Kiani[6]

[1] MSc Student in Parasitology, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] PhD Student in Parasitology, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Associate Professor, Department of Parasitology, Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] BSc in Health, Pakdasht Health Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[5] MSc Student in Biostatistics, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[6] Medical Student, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received October 12, 2015 ; Accepted November 13, 2016)

Abstract

Background and purpose: Recently, sporadic cases of cutaneous leishmaniasis (CL) has been reported in some parts of Pakdasht district, in southeast of Tehran, Iran. The aim of this study was to determine the prevalence of CL and identification of *Leishmania spp* in Pakdasht district.

Materials and methods: We conducted a cross-sectional study in suspected individuals of CL attending Pakdasht Health Center from March 2009 to November 2014. Diagnosis of disease was made based on direct smear of skin lesions and Giemsa staining. The kinetoplast DNA (kDNA) was then extracted by phenol-chloroform-isoamyl alcohol (PCI) and the species were identified using specific PCR method.

Results: Direct smears identified 57 (59.4%) positive cases (out of 96 suspected subjects). Among the subjects 37 (64.9%) were male and 20 (35.1%) were female. The majority of CL cases (54.4%) were detected in 2012, specially in October and November. The disease was more prevalent in those younger than 10 years of age (30.2%) and less prevalent in individuals aged 10-20 (13.6%). The majority of patients had a history of travel to Sabzevar district as an endemic area in Khorasan Razavi province and most of them were laborer. *L.major* was the predominant species isolated from all cases.

Conclusion: According to this study, Pakdasht district is not believed to be a CL focus since most cases were affected due to the travelling to the main endemic foci of CL.

Keywords: Cutaneous Leishmaniasis, Pakdasht, PCR, *L.major*

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(143): 241-246 (Persian).

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:59 +0330 on Thursday February 22nd 2018

گزارش کوتاه

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و ششم شماره ۱۴۳ آذر سال ۱۳۹۵ (۲۴۱-۲۴۶)

شناسایی مولکولی گونه های لیشمانیا جدا شده از بیماران مبتلا به لیشمانیوز پوستی در شهرستان پاکدشت، طی سال های ۹۳-۸۸

حسین پازوکی قوهه[۱]
عبدالستار پقه[۲]
مهدی فخار[۳]
غفور توکلی[۴]
عیسی نظر[۵]
مریم کیانی[۶]

چکیده

سابقه و هدف: در سال‌های اخیر موارد اسپورادیک لیشمانیوز پوستی از برخی مناطق شهرستان پاکدشت، واقع در جنوب شرقی شهر تهران، گزارش شده است. لذا هدف از این مطالعه، بررسی روند شیوع این بیماری و شناسایی گونه‌های لیشمانیا در شهرستان پاکدشت بود.

مواد و روش‌ها: این مطالعه توصیفی مقطعی از ابتدای فروردین ماه ۱۳۸۸ تا پایان آبان ماه ۱۳۹۳ بر روی افراد مشکوک به لیشمانیوز پوستی مراجعه کننده به آزمایشگاه مرکز بهداشت شهرستان پاکدشت صورت گرفت. تشخیص بیماری با تهیه اسمیر مستقیم از ضایعات پوستی و رنگ‌آمیزی گیمسا انجام گرفت. پس از استخراج DNA کینتوپلاستی از روی اسلایدهای با روش فنل کلروفرم ایزوآمیل الکل، از روش PCR اختصاصی برای تعیین گونه انگل، استفاده گردید.

یافته‌ها: از مجموع ۹۶ مورد مشکوک بیماری، در ۵۷ مورد (۵۹/۴ درصد) اجسام لیشمن شناسایی شد. از این تعداد، ۳۷ نفر مذکر (۶۴/۹ درصد) و ۲۰ نفر مونث (۳۵/۱ درصد) بودند. بیش‌ترین موارد بیماری مربوط به سال ۱۳۹۱ با ۳۱ مورد (۵۴/۴ درصد) و مربوط به ماه‌های مهر و آبان بوده است. بیش‌ترین فراوانی (۳۰/۲ درصد) در گروه سنی کم‌تر از ۱۰ سال و کم‌ترین فراوانی (۱۳/۶ درصد) در گروه سنی ۱۰ تا ۲۰ سال بود. هم‌چنین اغلب بیماران سابقه مسافرت به منطقه آندمیک سبزوار (استان خراسان رضوی) را داشته‌اند و شغل اغلب آن‌ها کارگری بود. در این مطالعه، گونه انگل شناسایی شده در تمام بیماران، *لیشمانیا ماژور* بود.

استنتاج: با توجه به نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد که شهرستان پاکدشت کانون بیماری لیشمانیوز پوستی نبوده و ابتلا به این بیماری به دنبال مسافرت افراد به کانون‌های بومی بیماری صورت گرفته است.

واژه های کلیدی: لیشمانیوز پوستی، پاکدشت، PCR، لیشمانیا ماژور

مقدمه

لیشمانیوز پوستی از مهم‌ترین عفونت‌های انگلی است که عامل آن تک یاخته‌ای ازجنس لیشمانیا می‌باشد. انتقال این بیماری به وسیله پشه‌های خاکی ماده جنس فلبوتوموس صورت می‌گیرد(۱). این بیماری در بیش از ۷۰

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۱۱۶۶ است که توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تامین شده است.

مولف مسئول: مهدی فخار- ساری: کیلومتر ۱۸ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم(ص) ، دانشکده پزشکی E-mail: mahdif53@yahoo.com
۱. دانشجوی کارشناس ارشد انگل شناسی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. دانشجوی دکتری انگل شناسی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. دانشیار، گروه انگل شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. کارشناس آزمایشگاه، مرکز بهداشت شهرستان پاکدشت، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
۵. دانشجوی کارشناس ارشد آمار، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۶. دانشجوی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت : ۱۳۹۴/۷/۲۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۴/۷/۲۷ تاریخ تصویب : ۱۳۹۵/۸/۲۳

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:59 +0330 on Thursday February 22nd 2018

کشور دنیا به صورت آندمیک وجود دارد. در منطقه خاورمیانه از نظر موارد ابتلا به این بیماری، ایران رتبه نخست را دارد(۲). سالیانه حدود ۱/۵ میلیون مورد از این بیماری در دنیا گزارش می‌شود(۴،۳) که این آمار در ایران حدود ۲۰ هزار نفر می‌باشد(۵). شناسایی گونه با روش‌های ملکولی جهت پیشگویی پاسخ به درمان و تجویز رژیم درمانی مناسب و اختصاصی، ضروری می‌باشد. پروتکل درمانی در افراد مبتلا به سالک نوع شهری و روستایی متفاوت می‌باشد(۷،۶). شهرستان پاکدشت در جنوب شرقی شهر تهران (به عنوان یکی از کانون‌های قدیمی لیشمانیوز نوع شهری) و در مجاورت ابردژ ورامین، یکی از کانون‌های لیشمانیوز پوستی نوع روستایی در استان تهران واقع شده است(۱۰-۸). مطالعه حاضر با هدف بررسی روند شیوع این بیماری و تعیین گونه های مختلف انگل لیشمانیا در شهرستان پاکدشت صورت گرفت.

مواد و روش ها

این مطالعه توصیفی- مقطعی از ابتدای فروردین ماه ۱۳۸۸ تا پایان آبان ماه ۱۳۹۳ بر روی افراد مشکوک به لیشمانیوز پوستی مراجعه‌کننده به آزمایشگاه مرکز بهداشت شهرستان پاکدشت صورت گرفت.

اطلاعات دموگرافیک هر بیمار نظیر سن، جنس، محل زندگی، تاریخ بروز بیماری، تعداد ضایعه، محل ضایعه و سابقه سکونت یا مسافرت یک سال قبل از ابتلا، در پرسش‌نامه مربوطه وارد گردید. تشخیص بیماری با تهیه اسمیر مستقیم از ضایعات و رنگ‌آمیزی به روش گیمسا بود. لام‌های تهیه شده به روش گیمسا رنگ‌آمیزی شده و در زیر میکروسکوپ نوری، از لحاظ وجود آماستیگوت‌ها (اجسام لیشمن) بررسی شدند. به منظور شناسایی گونه انگل‌های لیشمانیا با روش PCR (واکنش زنجیره‌ای پلیمراز)، اسلایدای رنگ‌آمیزی شده بیماران جهت استخراج به دانشگاه علوم پزشکی مازندران منتقل گردید. برای استخراج DNA از روش فنل کلروفرم ایزوآمیل الکل استفاده گردید(۱۱). سپس DNA استخراج شده، جهت انجام آزمایش PCR اختصاصی گونه مورد استفاده قرار گرفت(۱۳،۱۲). اطلاعات به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و آزمون کای دو مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

یافته ها و بحث

در این مطالعه، از مجموع ۹۶ بیمار مشکوک به لیشمانیوز پوستی مراجعه‌کننده به مرکز بهداشت شهرستان پاکدشت، تنها در ۵۷ مورد (۵۹/۴ درصد) با هر دو روش میکروسکوپی و PCR، اجسام لیشمن شناسایی شد. از این تعداد، ۳۷ نفر مذکر (۶۴/۹ درصد) و ۲۰ نفر مونث (۳۵/۱ درصد) بودند. از لحاظ آماری، اختلاف معنی‌داری بین فراوانی بیماری و جنس مشاهده گردید (p=۰/۰۴) که در سایر مناطق آندمیک ایران نیز همین‌گونه بود(۱۵،۱۴). از نظر سال وقوع بیماری، بیش‌ترین میزان فراوانی بیماری با ۳۱ مورد (۵۴/۴ درصد) در سال ۱۳۹۱ ثبت شد. از نظر گروه‌های مختلف سنی، بیش‌ترین موارد بیماری در گروه سنی کم‌تر از ۱۰ سال با ۳۰/۲ درصد و کم‌ترین تعداد در گروه سنی ۱۰ تا ۲۰ سال (۱۳/۶ درصد) بود که با سایر مطالعات انجام شده در مناطق آندمیک ایران نیز مطابقت دارد(۱۷،۱۶،۱۴). از نظر تعداد ضایعه، اختلاف آماری معناداری در گروه‌های سنی مختلف وجود نداشت (p=۰/۱). از نظر محل ضایعه، ۴۵/۸ درصد موارد بر روی دست، ۲۸/۱ درصد بر روی پا، ۱۰/۴ درصد بر روی صورت و ۱۵/۶ درصد در سایر قسمت‌های بدن بودند. از نظر محل ضایعه، اختلاف معنادار آماری بین اندام‌های مختلف بدن مشاهده گردید (p= <۰/۰۰۱).

نتایج نشان داد که موارد بیماری به طور معنی‌داری در فصل پاییز افزایش یافته و بیش ترین موارد مربوط به ماه آبان با ۴۰ درصد و کم‌ترین موارد مربوط به ماه خرداد (۱ درصد) بود که این مطلب به دلیل مدت زمان

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:59 +0330 on Thursday February 22nd 2018

دوره کمون بیماری می‌باشد. در دو مطالعه قبلی در شهرستان پاکدشت و سایر مطالعات انجام شده در ایران نیز بین فصول مراجعه و تعداد موارد بیماری ارتباط معنی‌داری گزارش شده است که براساس آن، فصل پاییز بیش‌ترین تعداد و فصل بهار کم ترین موارد ابتلا را به خود اختصاص داده است(۲۲-۱۸).

در مطالعه حاضر، اکثر بیماران (بیش از ۸۰ درصد) دارای سابقه مسافرت به شهرهای سبزوار، مشهد، کاشان، دامغان، گلستان، اصفهان، قم و هم‌چنین کشور افغانستان را داشتند و تنها ۸ بیمار (۸/۳ درصد) بدون سابقه مسافرت به مناطق آلوده بودند. بیش ترین تعداد بیماران را افراد دارای سابقه مسافرت به سبزوار تشکیل می‌دادند (۳۷/۵ درصد). اختلاف معنی‌داری بین فراوانی بیماری و سابقه مسافرت به مناطق آلوده مشاهده شد (p= <۰/۰۰۱). نکته مهم در مطالعه حاضر این است که اکثر بیماران (۹۱/۷ درصد) قبل از بروز ضایعه، دارای سابقه مسافرت به کانون‌های آندمیک شامل شهرهای سبزوار(۲۳)، مشهد (۲۴)، کاشان(۲۵)، دامغان(۲۶)، گلستان(۲۷)، اصفهان(۲۸) و هم‌چنین کشور افغانستان(۳۰،۲۹) می‌باشند. هم‌چنین بیش‌ترین تعداد بیماران را افراد با سابقه مسافرت به سبزوار (عمدتاً بخش کلاته عرب) تشکیل می‌دادند. در مجموع فقط ۸ مورد (۸/۳ درصد) بدون سابقه مسافرت به مناطق آندمیک بودند، که این خود نشان دهنده وارده بودن بیماری لیشمانیوز در شهرستان پاکدشت است.

در مطالعه حاضر، ۵۷ مورد بیماری لیشمانیوز پوستی با عامل *لیشمانیا ماژور* با هر دو روش میکروسکوپی و PCR در افراد مراجعه‌کننده به آزمایشگاه مرکز بهداشت شهرستان پاکدشت شناسایی شد. در این مطالعه، بررسی نمونه‌ها با روش PCR نشان داد گونه انگل در مقایسه با گونه‌های مرجع در تمام نمونه‌های مورد بررسی، *لیشمانیا ماژور* بود.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد گونه غالب انگل در شهرستان پاکدشت، *لیشمانیا ماژور* می‌باشد. با توجه به این که بیش‌تر بیماران دارای سابقه مسافرت به سبزوار بودند و بر اساس مطالعه مهاجری و همکاران، گونه غالب بیماری در سبزوار *لیشمانیا ماژور* می‌باشد(۲۳)، لذا پیشنهاد می‌شود با جداسازی انگل با روش کشت میکروکالچر و سپس تایپینگ به روش میکروستلایت بر روی ایزوله‌های جدا شده از بیماران این منطقه، میزان هموژنیسیتی و یا هتروژنیسیتی سوش‌های جدا شده با سایر مناطق آندمیک ایران مقایسه شوند(۳۲،۳۱). با توجه به موارد فوق، به نظر می‌رسد شهرستان پاکدشت، کانون آندمیک بیماری لیشمانیوز پوستی نمی‌باشد و بیماری در طی مسافرت افراد به کانون‌های بیماری صورت گرفته است.

سپاسگزاری

این مطالعه حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی شماره ۱۱۶۶ دانشگاه علوم پزشکی مازندران و پایان نامه خانم مریم کیانی دانشجوی پزشکی می‌باشد. لذا از معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تشکر می‌نماییم.

References

1. Lane RP. Sandflies (phlebotominae): Medical insects and arachnids: Springer; 1993. p. 78-119.
2. Postigo JA. Leishmaniasis in the World Health Organization Eastern Mediterranean Region. Int J Antimicrob Agents 2010; 36 (Suppl 1): S62–S65.
3. World Health Organization (WHO). Manual for case management of cutaneous leishmaniasis in the WHO Eastern Mediterranean Region. Eastern Medite 2013. W rranean Series HO Regional Publications.
4. Postigo JA. Leishmaniasis in the world health organization eastern mediterranean region. Int J Antimicrob Agents 2010; 36(suppl 1): S62-S65.
5. Shirzadi MR, Sharifian J, Zeinali M,

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:59 +0330 on Thursday February 22nd 2018

Qarahgozloo F, Pourmozaffari J. Successful in zoonosis control programmes. 1st ed. Tehran: Ministry of Health and Medical) Education publications. 2009 (Persian).

6. Pazoki-ghohe H, Haghparast-kenari B, Fakhar M. Current and novel laboratory diagnostic methods and identification of causative agents for cutaneous leishmaniasis. J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(132): 350-366 (Persian).
7. Al-Jawabreh A, Schoenian G, Hamarsheh O, Presber W. Clinical diagnosis of cutaneous leishmaniasis: A comparison study between standardized graded direct microscopy and ITS1-PCR of Giemsa-stained smears. Acta Trop 2006; 99(1): 55-61.
8. Nadim A, Javadian E, Mohebali M. Leishmania and leishmaniasis. Tehran university of medical Science publication center: 2008 (persian).
9. Pakdasht. Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Pakdasht. Accessed May 2, 2016.
10. Nekouie H, Assmar M, Razavi M, Naddaf S. A study on Leishmania infection rate among Phlebotomus spp. collected from Abardejh district, Iran. Iranian J Vet Res 2006; 7(4): 77-81.
11. Karamian M, Motazedian MH, Fakhar M, Pakshir K, Jowkar F, Rezanezhad H. Atypical presentation of Old-World cutaneous leishmaniasis: diagnosis and species identification by PCR. J Eur Acad Dermatol Venereol 2008; 22(8): 958-962.
12. Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. J Clin Microbiol 2002; 40(1): 210-215.
13. Aransay AM, Scoulica E, Tselentis Y. Detection and identification of Leishmania DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. Appl Environ Microbiol 2000; 66(5): 1933-1938.
14. Pagheh AS, Fakhar M, Mesgarian F, Rahimi-esboei B, Badiee F. Incidence trend of rural cutaneous leishmaniasis in Gonbad-e-Qabus city,(Golestan, Iran) during 2009-2012. J Mazandaran Univ Med Sci 2013; 23(104): 27-33.
15. Zahirnia AH, Moradi AR, Norozi NA, Bathaii JN, Erfani H, A M. Epidemiological Survey of Cutaneous Leishmaniasis in Hamadan Province (2002-2007). Sci J Hamdan Univ Med Sci. 2009;16(1): 43-47.
16. Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice. Natu Rev Immunol 2002; 2(11): 845-858.
17. Fakhar M, Mikaeili F, Hatam GR, Habibi P, Karamian M, Motazedian MH, et al. Molecular epidemiology survey of cutaneous leishmaniasis in referral patients to Parasitology lab at Shiraz‘s School of Medicine and importance application of PCR for diagnosis of disease. J Jahrom Univ Med Sci 2010; 8(10): 1-6.
18. Bacaër N, Guernaoui S. The epidemic threshold of vector-borne diseases with seasonality. J Math Biol 2006; 53(3): 421-436.
19. Kolivand M, Fallah M, Salehzadeh A, Davari B, Poormohammadi A, Ghohe HP, et al. An epidemiological study of cutaneous leishmaniasis using active case finding among elementary school students in Pakdasht, Southeast of Tehran, Iran 2013-2014. J Res Heal Sci 2015; 15(2): 104-108.

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:59 +0330 on Thursday February 22nd 2018

20. Maghsoud A, Pourmohamadi A, Hoseinizijvad M, Tavakoli G, Kolivand M. Survey prevalence of cutaneous leishmaniasis in Pakdasht county in 2012. Pajouhan Sci J 2014; 12(2): 37-46.
21. Ramezani Y, Mousavi SGA, Bahrami A, Fereydooni M, Parsa N, Kazemi B. Epidemiological study of cutaneous leishmaniasis in Aran and Bidgol from April to September 2009. Feyz (J Kashan Univ Med Sci) 2011; 15(3): 258-254.
22. Pagheh AS, Fakhar M, Sharif M, Danesh V, Ahmadi Z. Epidemiological survey of cutaneous leishmaniasis due to Leishmania tropica in a new focus in Khorasan Razavi Province. J Mazandaran Univ Med Sci 2013; 23(103): 46-52.
23. Mohajery M, Shamsian AA, Rezaie AR, Hassanpoor K, Shakeri MT, Farnoosh GH. Identification of molecular species of CL in the city of Sabzevar. Mashhad J Med Sci. 2008; 53(3): 138-144 (Persian).
24. Mahmoodi MR, Mahajeri M, Tavakkkol Afshari J, Shakeri MT, Yazdanpanah MJ, Berenji F, et al. Molecular identification of Leishmania species causing cutaneous leishmaniasis in Mashhad, Iran. Jundishapur J Microbiol 2010; 3(4): 195-200.
25. Doroodgar A, Mahbobi S, Nemetian M, Sayyah M, Doroodgar M. An epidemiological study of cutaneous leishmaniasis in Kashan (2007-2008). Koomesh 2009; 10(3): 177-184.
26. Mohammadi Azni S, Nokandeh Z, Khorsandi A, Sanei Dehkordi A. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Damghan. J Army Univ Med Sci I.R.Iran 2010; 12(3): 131-135.
27. Pagheh AS, Fakhar M, Mesgarian F, Gholami Sh, Badiee F. Detection and identification of causative agent of cutaneous leishmaniasis in referred patients to the Health center of Gonbad-e-Qabus from Golestan Province using specific PCR. J Mazandaran Univ Med Sci 2012; 22(Suppl 1): 85-92.
28. Nadim A, Faghih M. The epidemiology of cutaneous leishmaniasis in the Isfahan province of Iran I. The reservoir II. The human disease. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 1968; 62(4): 534-542.
29. Van Thiel P-P, Leenstra T, de Vries HJ, van der Sluis A, van Gool T, Krull AC, et al. Cutaneous leishmaniasis (Leishmania major infection) in Dutch troops deployed in northern Afghanistan: epidemiology, clinical aspects and treatment. Am J Trop Med Hyg 2010; 83(6): 1295-1300.
30. Fakhar M, Pazoki Ghohe H, Rasooli SA, Karamian M, Mohib AS, Ziaei Hezarjaribi H, et al. Genetic diversity of Leishmania tropica strains isolated from clinical forms of cutaneous leishmaniasis in rural districts of Herat province, Western Afghanistan, based on ITS1-rDNA. Infect Gene Evol 2016; 41(1): 120-127.
31. Fakhar M, Motazedian MH, Daly D, Lowe CD, Kemp SJ, Noyes HA. An integrated pipeline for the development of novel panels of mapped microsatellite markers for *Leishmania donovani* complex, *Leishmania braziliensis* and *Leishmania major*. Parasitology 2008; 135(5): 567-574.
32. Pagheh A, Fakhar M, Mesgarian F, Gholami S, Ahmadpour E. An improved microculture method for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. J Parasit Dis 2014; 38(4): 347-351.