



© İsa An,
© Mehmet Harman*,
© İbrahim Çavuş**,
© Ahmet Özbilgin**

Kutanöz Leishmaniasiste Deneyimli Uzman ve Rutin Mikrobiyoloji Laboratuvarı Tarafından Yapılan Lezyonal Yaymaların Tanısal Değeri

The Diagnostic Value of Lesional Skin Smears Performed by Experienced Specialist in Cutaneous Leishmaniasis and Routine Microbiology Laboratory

Öz

Amaç: Leishmaniasis, 98 ülkede 12 milyon insanı etkileyen vektör kaynaklı yaygın bir enfeksiyondür. Tanıda en sık kullanılan yöntem leishmania yaymaların mikroskopik incelemesidir. Bu yöntemin tanısal değeri değerlendiricinin deneyimine göre değişkenlik gösterir. Bu çalışmada kutanöz leishmaniasis tanısında lezyonal yaymaların değerlendirilmesinde deneyimin ne kadar önemli olduğunun saptanması amaçlandı.

Yöntemler: Bu çalışmaya 2016 yılının Ocak ve Aralık ayları arasında Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Deri ve Zührevi Hastalıklar Polikliniği'ne başvuran ve deri leishmaniasisi kuşkusu uyandıran lezyonlara sahip hastalar alındı. Bu hastaların tümünden hem rutin mikrobiyoloji laboratuvarında hem de kutanöz leishmaniasisin klinik ve tanısında deneyimli uzman tarafından olmak üzere ayrı yaymalar yapıldı ve birbirlerinden bağımsız olarak değerlendirildi.

Bulgular: Çalışmaya alınan 98 olgunun 70'inde kutanöz leishmaniasis tanısı laboratuvar değerlendirmeleri ile doğrulandı. Kutanöz leishmaniasisin klinik ve tanısında deneyimli uzman tarafından yapılan yaymaların pozitifliği (%95,7) rutin mikrobiyoloji laboratuvarı tarafından yapılan yaymaların pozitifliğinden (%42,9) yüksekti ($p<0,001$).

Sonuç: Çalışmamızdaki veriler gösterdi ki kutanöz leishmaniasis tanısı için yaymalar kutanöz leishmaniasisin klinik ve tanısında deneyimli uzmanlar tarafından yapılmalı ve değerlendirilmelidir.

Anahtar kelimeler: Kutanöz leishmaniasis, yayma, tanı, GZ-PZR, kültür

Abstract

Objective: Leishmaniasis is a common vector-borne infection affecting 12 million people in 98 countries. The most frequently used method in diagnosis is the microscopic investigation of the leishmania smears. The diagnostic value of this method varies according to the experience of the evaluator. In this prospective study, it was aimed to emphasize the importance of experience in the evaluation of lesional smears used in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis.

Methods: In this study, patients who were admitted to Dicle University Medical Faculty Hospital Dermatological and Venereal Diseases Outpatient Clinic between January and December 2016 and who had lesions with suspicious cutaneous leishmaniasis were included. For all the cases, both in the routine microbiology laboratory and in the diagnosis and treatment of cutaneous leishmaniasis, separate smears were performed by an experienced specialist and evaluated independently from each other.

Results: In 70 of 98 cases studied, the diagnosis of cutaneous leishmaniasis was confirmed by laboratory evaluations. The rate of positivity was significantly higher in the smears analyzed by experienced specialist in the clinical and diagnosis of cutaneous leishmaniasis (95.7%) than in the smears analyzed by the routine microbiology laboratory (42.9%) ($p<0.001$).

Şanlıurfa Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Deri ve Zührevi Hastalıklar Kliniği, Şanlıurfa, Türkiye

*Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Deri ve Zührevi Hastalıklar Anabilim Dalı, Diyarbakır, Türkiye

**Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye

Yazışma Adresi/ Correspondence:

İsa An, Şanlıurfa Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Deri ve Zührevi Hastalıklar Kliniği, Şanlıurfa, Türkiye
E-posta: is_an89@hotmail.com
ORCID-ID: orcid.org/0000-0003-3366-4551
Geliş Tarihi/Submitted: 16.08.2018
Kabul Tarihi/Accepted: 8.10.2018

Abstract

Conclusion: The data in our study showed that smears should be performed and evaluated by experienced specialists in the clinical and diagnosis of cutaneous leishmaniasis.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis, smear, diagnosis, RT-PCR, culture

Giriş

Leishmaniasis, leishmania cinsi protozoonların neden olduğu, deri lezyonlarından sistemik hastalıklara uzanan geniş spektrumlu multisistemik bir hastalıktır. Kutanöz leishmaniasis (KL) deride uzun süren nodülo-ülseratif lezyonlarla seyredip atrofik skarlarla iyileşen bir deri hastalığı tablosudur. Hastalığın klinik ve epidemiyolojik özellikleri parazitler, konak ve çevreyi içeren çok sayıda faktörün rol oynamasına bağlı olarak değişmektedir (1-3).

KL tanısı; mikroskopik inceleme, kültür ortamında izolasyon, genomda bulunan spesifik dizilerin moleküler yöntemlerle incelenmesi yöntemleri ile veya hasta serumunda antikorların arandığı serolojik testlerle yapılabilmektedir. Direkt mikroskopide amastigotların görülebilirliği tecrübe gerektirir. Literatürde bu yöntemle olgularda %30 ile %96,2 arasında değişen oranlarda hastalık etkeni mikroorganizmaların saptandığı bildirilmektedir. Bu oranların farklı olmasında; lezyondan materyal alma yeri ve yöntemi, yaymaların hazırlanma biçimi ve mikroskopik incelemeyi yapan kişinin deneyimi etkili olmaktadır (4,5).

Bu çalışmada KL tanısında lezyonal yaymaların değerlendirilmesinde deneyimin ne kadar önemli olduğunun saptanması amaçlandı.

Yöntemler

Çalışmaya 2016 yılının Ocak ve Aralık ayları arasında, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Deri ve Zührevi Hastalıklar Polikliniği'ne başvuran her yaş ve cinsiyetten, öykü-fizik muayene ile KL olduğu düşünülen 98 hasta dahil edildi. Bu hastalar arasında tanısı doğrulanan 70 olgu değerlendirildi.

Deri ve zührevi hastalıklar polikliniği'ne başvuran ve KL düşünülen hastalar ilk önce rutin mikrobiyoloji laboratuvarına yönlendirildi. Burada her hastadan 2 adet yayma preparat hazırlanıp mikroskopik inceleme yapıldı. Daha sonra aynı hastalar KL'nin klinik ve tanısında deneyimli uzman tarafından değerlendirildi. Papül, nodül, plak gibi solid lezyonlardan sitolojik örnek almak için dermal kazıntı yöntemi kullanıldı. Örnek alınacak bölge alkollü spanç ile silindikten sonra solid lezyonlar dominant olmayan elin baş ve işaret parmağı arasında sıkıştırıldı, bistüri (15 numara) yardımı ile yaklaşık 5 mm uzunluğunda ve 2-3 mm derinliğinde minik bir insizyon yapıldı. Bistüri ile dermal bölgeden kazıntı yapılarak elde edilen materyaller lam üzerine yayıldı. Üzeri krutlu ülser lezyonlarda ise bistüri ile krut bir kenarından hafifçe kaldırıldıktan sonra açığa çıkan ülser yüzeyinden bistüri ile kazıntı yapıldı. Direkt mikroskopik inceleme için alınan örnek lam üzerine ince bir şekilde yayıldı. Tüm hastalardan en az 4 adet yayma hazırlandı. Bu yaymaların 2'si metil alkolle tespit

edildikten sonra Giemsa ile boyanarak mikroskop altında leishmania amastigotlarının varlığı açısından en az 5 dakika süre ile incelendi. Mikroskopik incelemede, yuvarlak veya oval şekilli, bir köşede koyu mor renkli nükleusu ve bunun hemen yanında kinetoplastı bulunan, sitoplazması soluk mavi renkte yapılar şeklinde görülen amastigot bulunduran yaymalar pozitif olarak kabul edildi.

Hastalardan alınan 4 preparatın ikisi ise moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

Kültür için lezyondan elde edilen örnekten modifiye Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) besiyerlerine ekim yapıldı. Besiyerleri 260 °C'de saklanmış ve promastigotların varlığı açısından bir ay süreyle gün aşırı kontrol edildi. İlk üremenin gerçekleştiği besiyerlerinden örnekler alındı. Alınan örnekler fazla miktarda üretmek amacıyla Media Designed at Roswell Park Memorial Institute-1640 besiyerinde kültüre alındı.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile genotiplendirme çalışmalarında, leishmania parazitlerinin ssu rRNA ve 5,8S rRNA'yı kodlayan genleri ayıran ribozomal internal transcribed spacer 1 bölgesi primer ve problemleri kullanılarak gerçek zamanlı (GZ)-PZR testi uygulandı (6).

Preparatlar steril bir bistüri yardımıyla steril bir petri içersine kazanarak preparat üzerindeki materyal alındı. Bu materyal 1,5 mL'lik ependorf tüpüne aktarıldı ve 200 µL steril phosphate-buffered saline ilave edilerek, iyice karıştırıldı. Daha sonra DNA izolasyon işlemi gerçekleştirildi. DNA izolasyon işlemi ROCHE High Pure PCR Template Preparation Kit'i kullanılarak talimatlara uygun şekilde yapıldı.

GZ-PZR analiz işlemi için toplam 25 µL'lik reaksiyon karışımı (20-50 ng genomik DNA, 1,5 µL H₂O (PCR grade water), 10 µm forward ve reverse primerlerden 1 µL, her bir 4 µm probe için 0,5 µL, 12,5 µL 2X QuantiTect Probe PCR Kit Master karışımı) hazırlandı.

GZ-PZR cihazında (Rotor-Gene® Q) uygulanan protokol; ön denatürasyon 95°C 15 dakika devamında 40 döngü (95°C 15 saniye denatürasyon, 50°C 30 saniye bağlanma, 72°C 20 saniye uzama), sonlanma 95°C 1 dakika ve 40°C 1 dakika daha sonra melting uygulanarak tür ayrımı yapılmıştı.

İstatistiksel Analiz

Çalışmaya dahil edilen hastaların tüm verileri istatistiksel analiz SPSS 18.0 for Windows (SPSS Inc. Chicago, IL, USA) paket programı kullanılarak yapıldı. P değeri 0,05'in altında olduğunda anlamlı olarak kabul edildi.

Bulgular

Bu çalışmada öykü-fizik muayene ile KL olduğu düşünülen 98 hasta arasında tanısı çeşitli laboratuvar yöntemleri

ile doğrulanmış 70 hasta değerlendirmeye alındı. Tanısı doğrulanmış hastaların tümünde kültür ve GZ-PZR pozitif idi.

Hastaların örneklerinden yapılan GZ-PZR analizlerinde 49 (%70) hastada *L. tropica*, 14 (%20) hastada *L. major* ve 7 (%10) hastada *L. infantum/L. donovani* tespit edildi (Tablo 1).

Rutin mikrobiyoloji laboratuvarı tarafından yapılan yaymalarda 30 (%42,9) olguda, KL'nin klinik ve tanısında deneyimli uzman tarafından yapılan yaymalarda ise 67 (%95,7) olguda pozitiflik tespit edildi ($p < 0,001$).

Rutin mikrobiyoloji laboratuvarı tarafından yapılan yaymalarda, KL'nin klinik ve tanısında deneyimli uzman tarafından yapılan yaymalarda, modifiye NNN kültürde ve GZ-PZR'de pozitiflik oranları sırasıyla %42,9, %95,7, %100 ve %100 olarak saptandı ($p = 0,048$) (Tablo 2).

Tartışma

Ülkemizde KL sık görülen bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Özellikle Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu

bölgesinde görülmesine rağmen, diğer bölgelerde de sporadik olgular bildirilmektedir (7-9).

L. tropica ve *L. major* başlıca Akdeniz havzası, Ortadoğu, Kafkasya ve Orta Asya'da, sıklıkla visseral hastalık yapan *L. infantum* Akdeniz'e kıyısı olan ülkelerde KL'ye yol açar (2,8,9).

Eroğlu ve ark., (8) KL'li hasta örneklerinden izole edilen leishmania izolatlarının tiplendirildiği çalışmada %31,5 oranında *L. infantum*, %68,5 oranında *L. tropica* bildirilmiştir. Serin ve ark., (10) KL olgularının %30'unda *L. infantum* ve %70'inde *L. tropica* tespit etmişlerdir. Özbilgin ve ark., (11) 2011-2014 yılları arasında Türkiye'de *L. major*un etken olduğu 18 KL olgusu bildirmişlerdir. Türkiye'de *L. major* enfeksiyonlarının görülme sıklığındaki artış birkaç faktöre bağlanmıştır. Bu faktörlerden en önemlisi Türkiye'nin komşuları olan Irak ve Suriye'den olan mülteci göçüdür.

Bizim çalışmamızda Türkiye'de yapılan çalışmaları kapsayan literatür bilgileriyle uyumlu olarak 49 (%70) hastada *L. tropica*, 14 (%20) hastada *L. major* ve 7 (%10) hastada *L. infantum/L. donovani* tespit edilmiştir.

KL klinik olarak birçok deri hastalıklarını taklit edebilir. Bu nedenle KL tanısı mutlaka laboratuvar tanısı ile doğrulanmalıdır. KL tanısı; mikroskopik inceleme, kültür ortamında izolasyon, genomda bulunan spesifik dizilerin moleküler yöntemlerle incelenme, antijenlerinin gösterildiği (direkt aglütinasyon testi, rK39) direkt yöntemler veya hasta serumunda antikorların arandığı serolojik testlerle yapılabilmektedir (12-16). PZR tabanlı yöntemler düşük parazit yükü bulunan olguları bile iyi analiz edebilmesinden

Tablo 1. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile saptanan leishmania türleri

GZ-PZR sonucu	Sayı	%
<i>L. tropica</i>	49	70,0
<i>L. major</i>	14	20,0
<i>L. infantum/L. donovani</i>	7	10,0
Toplam	70	100,0

GZ-PZR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

Tablo 2. Rutin mikrobiyoloji laboratuvarı smear, kutanöz leishmaniasisin klinik ve tanısında deneyimli uzman smear, modifiye Novy-Macneal-Nicolle kültür yöntemi ve GZ-PZR pozitifliği karşılaştırılması

	Rutin mikrobiyoloji laboratuvarı smear		Kutanöz leishmaniasisin klinik ve tanısında deneyimli uzman smear		Modifiye NNN		GZ-PZR		p değeri
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	
Sayı	30	40	67	3	70	0	70	0	0,048
Yüzde (%)	42,9	57,1	95,7	4,3	100	0	100	0	

GZ-PZR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, NNN: Novy-Macneal-Nicolle

Tablo 3. Literatürdeki smear pozitiflik oranları

Yazarın adı	Çalışmanın yapıldığı ülke	Smear pozitiflik yüzdesi	Kaynak numarası
Rahman ve ark.	Pakistan	30	5
Dar ve ark.	Pakistan	32	18
Aviles ve ark.	Ekvador	42	19
Sharquie ve ark.	Irak	60	25
Rodriguez ve ark.	Venezuela	63	20
Tareen ve ark.	Pakistan	76	21
Gurel ve ark.	Türkiye	78	22
El-Safi ve ark.	Sudan	88	23
Uzun ve ark.	Türkiye	90	24
Khatri ve ark.	Yemen	96,2	4

dolayı özellikle düşük parazit yükü bulunan olgularda tercih edilir (17,18).

Mikroskopik inceleme basit, ucuz bir yöntemdir. Literatürde bu yöntemle olguların %30 ile %96,2 arasında değişen oranında hastalık etkeni mikroorganizmaların saptandığı bildirilmektedir (4,5,19-26) (Tablo 3).

Bizim çalışmamızda rutin mikrobiyoloji laboratuvarı tarafından yapılan incelemede olguların %42,9'unda (30 olgu), KL konusunda KL'nin klinik ve tanısında deneyimli uzman tarafından yapılan incelemede ise olguların %95,7'sinde (67 olgu) amastigotlar saptanmıştır.

KL klinik ve tanısında deneyimli uzmanın smear pozitiflik oranının yüksek olmasının nedenlerinin; hastalığın klinik ve anamnez bulgularını iyi bilmek, yayma hazırlama ve inceleme konusunda deneyimli olmak, çok sayıda yayma preparatı hazırlamak ve özellikle kronik olgularda yaymaların daha uzun süre incelenmesi olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmanın Kısıtlılıkları

Bu çalışmanın kısıtlılığı sadece yayma sonuçlarının değerlendirilmesi nedeniyle deneyimin hangi aşamada etkili olduğunun saptanamamasıdır.

Çalışmamızda rutin mikrobiyoloji laboratuvarı tarafından yapılan yayma, KL'nin klinik ve tanısında deneyimli uzman tarafından yapılan yayma, modifiye NNN kültür yöntemi ve GZ-PZR pozitifliği sırasıyla %42,9, %95,7, %100 ve %100 olarak saptandı. Bu sonuçlara dayanılarak GZ-PZR ve modifiye NNN kültür laboratuvar yöntemlerinin KL tanısında yüksek duyarlılık ve özgünlüğe sahip olduğu söylenilebilir.

Dermatologlar KL'nin tanısı için basit, kolay uygulanabilen ve ucuz bir yöntem olan sitolojik incelemeye gerekli önemi vermemektedirler. Bu nedenle yaymalar, genellikle mikrobiyologlar tarafından değerlendirilmektedir. Sitolojik inceleme konusunda deneyimli olan dermatologlar tarafından yapılacak olan sitoloji kursları ile dermatologlar, yayma konusunda özendirilmelidir.

Sonuç

Sonuç olarak çalışmamızdaki veriler gösterdi ki KL tanısı için yaymalar KL'nin klinik ve tanısında deneyimli uzman tarafından alınmalı ve değerlendirilmelidir.

Etik

Etik Kurul Onayı: Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 27.02.2015/153 sayılı etik kurul onayı alınmıştır.

Hasta Onayı: Hastalardan yazılı onam formu alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu tarafından değerlendirilmiştir.

Yazarlık Katkıları

Konsept: İ.A., Dizayn: İ.A., M.H., Veri Toplama veya İşleme: İ.A., M.H., İ.Ç., A.Ö., Analiz veya Yorumlama: M.H., Literatür Arama: İ.A., Yazan: İ.A., M. H.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Yazarlar tarafından finansal destek almadıkları bildirilmiştir.

Kaynaklar

1. Uzun S, Gürel MS, Durdu M, et al. Clinical practice guidelines for the diagnosis and treatment of cutaneous leishmaniasis in Turkey. *Int J Dermatol* 2018;57:973-82.
2. Salman IS, Vural A, Unver A, et al. Cutaneous leishmaniasis cases in nızip, Turkey after the Syrian civil war. *Mikrobiyol Bul* 2014;48:106-13.
3. Turhanoglu M, Alp Erdal S, Bayindir Bilman F. A nine-year evaluation of cutaneous leishmaniasis patients in Diyarbakir Training and Research Hospital, Turkey. *Mikrobiyol Bul* 2014;48:335-40.
4. Khatri ML, Di Muccio T, Gramiccia M. Cutaneous leishmaniasis in North-Western Yemen: a clinicoepidemiologic study and leishmania species identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. *J Am Acad Dermatol* 2009;61:e15-21.
5. Rahman SB, Bari AU. Laboratory profile in patients of cutaneous leishmaniasis from various regions of Pakistan. *J Coll Physicians Surg Pak* 2003;13:313-36.
6. Özensoy Toz S, Çulha G, Yıldız Zeyrek F, et al. A real-time ITS1-pcr based method in the diagnosis and species identifications of leishmania parasite from human and dog clinical samples in Turkey. *Plos Negl Trop Dis* 2013;7:e2205.
7. Özbilgin A, Harman M, Karakaş M, et al. Leishmaniasis in Turkey: visceral and cutaneous leishmaniasis caused by leishmania donovani in Turkey. *Acta Trop* 2017;173:90-6.
8. Eroğlu F, Koltas IS, Genc A. Identification of causative species in cutaneous leishmaniasis patients using PCR-RFLP. *J Bacteriol Parasitol* 2011;2:113.
9. Harman M. Kutanöz leishmaniasis. *Türkiye Klinikleri J Dermatol-Special Topics* 2017;10:125-32.
10. 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;53:209-14.
11. Özbilgin A, Çulha G, Uzun S, et al. Leishmaniasis in Turkey: first clinical isolation of Leishmania major from 18 autochthonous cases of cutaneous leishmaniasis in four geographical regions. *Trop Med Int Health* 2016;21:783-91.
12. Harman M. Kutanöz leishmaniasis. *Turk J Dermatol* 2015;9:168-76.
13. Koltas IS, Eroglu F, Uzun S, et al. A comparative analysis of different molecular targets using PCR for diagnosis of old world leishmaniasis. *Exp Parasitol* 2016;164:43-8.
14. Koltas IS, Eroglu F, Alabaz D, et al. The emergence of Leishmania major and Leishmania donovani in southern Turkey. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2014;108:154-8.
15. Başsorgun Cİ, Ünal B, Karakaş AA, et al. Clinicopathological evaluation of cutaneous leishmaniasis in the mediterranean region of Turkey. *Turk Patoloji Derg* 2015;31:126-30.
16. Eroglu F, Koltas IS, Alabaz D, et al. Clinical manifestations and genetic variation of Leishmania infantum and Leishmania tropica in Southern Turkey. *Exp Parasitol* 2015;154:67-74.
17. Graça GC, Volpini AC, Romero GA, et al. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012;107:664-74.
18. Azmi K, Nasereddin A, Ereqat S, et al. Methods incorporating a polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism and their use as a 'gold standard' in diagnosing Old World cutaneous leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;71:151-5.
19. Dar NR, Khurshid T. Comparison of skin smears and biopsy specimens for demonstration of leishmania tropica bodies in

- cutaneous Leishmaniasis. *J Coll Physicians Surg Pak* 2005;15:765-67.
20. Aviles H, Belli A, Armijos R, et al. PCR detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. *J Parasitol* 1999;85:181-7.
 21. Rodriguez N, Guzman B, Rodas A, et al. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. *J Clin Microbiol* 1994;32:2246-52.
 22. Tareen A, Afaq S, Haque AU. Comparative study of the diagnosis of cutaneous leishmaniasis by slit skin smear and skin biopsy for histopathology. *JRMC* 2014;18:83-6.
 23. Gurel MS, Ulukanligil M, Ozbilge H. Cutaneous leishmaniasis in Sanliurfa: epidemiologic and clinical features of the last four years (1997-2000). *Int J Dermatol* 2002;41:32-7.
 24. el-Safi SH, Peters W, el-Toam B, et al. Studies on the leishmaniasis in the Sudan. 2. Clinical and parasitological studies on cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1991;85:457-64.
 25. Uzun S, Uslular C, Yucel A, et al. Cutaneous leishmaniasis: evaluation of 3,074 cases in the Cukurova region of Turkey. *Br J Dermatol* 1999;140:347-50.
 26. Sharquie KE, Hassen AS, Hassan SA, et al. Evaluation of diagnosis of cutaneous leishmaniasis by direct smear, culture and histopathology. *Saudi Med J* 2002;23:925-8.