مقاله پژوهشی

تعیین هویت انگل لیشمانیا با استفاده از تکنیک PCR-RFLP در لام های رنگ آمیزی شده مربوط به بیماران و جوندگان مخزن لیشمانیوز جلدی در شهرستان دامغان

صادق محمدی ازنی*، دکتر یاور راثی** ، دکتر محمدعلی عشاقی***، دکتر محمدرضا یعقوبی ارشادی**
دکتر مهدی محبعلی****، محمدرضا عبایی*****، دکتر هما حجاران******، زینب نوکنده*******

دریافت : ۸۹/۵/۲ ، پذیرش : ۸۹/۸/۳۰

چکیده:

مقدمه و هدف: لیشمانیوز یکی از مهمترین بیماری های عفونی جهان می باشد. این بیماری در بیش از نیمی از استان های ایران به عنوان مشکل بهداشتی مطرح می باشد. تشخیص مخازن بیماری و همچنین تعیین هویت نوع انگل در انسان در شناسایی جنبه های اپیدمیولوژیک بیماری وارائه برنامه کنترل اهمیت زیادی دارد.

روش کار: این مطالعه توصیفی در سال ۱۳۸۷ با استفاده از تکنیک PCR-RFLP در شهرستان دامغان انجام شده است. بررسی بر روی لام های رنگ آمیزی شده با گیمسا مربوط به بیماران مشکوک به سالک و همچنین جوندگان صید شده در روستاهای آلوده که از نظر اجسام لیشمن مثبت بوده اند انجام شده است. DNA انگل از روی لام ها استخراج و با استفاده از پرایمر های اختصاصی لیشمانیا جهت تکثیر قطعه ITS1 با روش Conventional PCR آزمایش شده اند و محصولات PCR تحت هضم آنزیمی (HaeIII) قرار گرفته اند.

نتایج: ۲۵ نمونه انسانی و ۸ نمونه ازجونده رومبومیس اپیموس مورد آزمایش PCR-RFLP قرار گرفتند. پس از الکتروفورز محصولات واکنش مشخص شد که انگل موجود در لام های انسانی وجوندگان، لیشمانیا ماژور (عامل لیشمانیوز جلدی روستایی) می باشد.

نتیجه نهایی: تکنیک PCR-RFLP روش موثری جهت تعیین گونه انگل لیشمانیا در لام های رنگ آمیزی شده با گیمسا که از انسان ومخازن حیوانی گرفته شده می باشد و از مزایای این روش این است که بدون انجام تعیین توالی، تشخیص گونه های انگل لیشمانیای ایجاد کننده بیماری امکان پذیر می گردد.

کلید واژه ها: سالک / لیشمانیا / واکنش زنجیره ای پلیمراز

مقدمه :

لیشمانیوزها (Leishmaniose) مجموعه ای از بیماریها هستند که توسط گروهی از انگل های داخل سلولی مربوط به جنس لیشمانیا(Leishmania) ایجاد می شوند. از بین ۳۰ گونه انگل لیشمانیای شناسایی شده ، حدود ۱۰ گونه از نظر پزشکی ودامپزشکی اهمیت دارند(۱).

تظاهرات این بیماری به سه شکل اصلی جلدی، احشایی و جلدی- مخاطی قابل مشاهده است(۲). به علت اهمیتی که این بیماری از نظر بهداشتی دارد، همواره مورد توجه سازمان جهانی بهداشت بوده است . در حال حاضر

* کارشناس ارشد حشره شناسی پزشکی مرکز بهداشت دامغان دانشگاه علوم پزشکی سمنان (sadegh_azni@yahoo.com)
** استاد گروه حشره شناسی پزشکی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
*** دانشیار گروه حشره شناسی پزشکی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
**** استاد گروه انگل شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
***** عضو هیأت علمی گروه حشره شناسی پزشکی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
****** دانشیار گروه انگل شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
******* کارشناس میکروبیولوژی مرکز بهداشت دامغان دانشگاه علوم پزشکی سمنان

Archive of SID
www.SID.ir

حداقل۸۸ کشور جهان در قاره های آسیا، اروپا، آفریقا و آمریکا به انواع مختلف این بیماری آلوده می باشند. شیوع آن ۱۴ -۱۲ میلیون مورد گزارش شده است و میزان بروز سالیانه آن حدود ۲-۱/۵ میلیون مورد است(۳،۴).

لیشمانیوز دربیش از نیمی از استان های کشور ایران وجود دارد وسالیانه بیش از۲۰هزار مورد بیماری گزارش می شود(۵).

لیشمانیوز جلدی در ایران به دو شکل خشک(شهری) و مرطوب(روستایی) دیده می شود. در نوع روستایی که در اثر لیشمانیا ماژور بوجود می آید جوندگان به عنوان مخزن مطرح هستند و ناقل اصلی بیماری پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی است اما در نوع شهری که عامل آن لیشمانیا تروپیکا است مخزن اصلی بیماری انسان و ناقل اصلی فلبوتوموس سرژانتی می باشد(۲،۶،۷). با توجه به خصوصیات بیولوژیک انگل،مخازن وناقلین روش های مبارزه با این دو نوع بیماری متفاوت می باشد لذا شناسایی گونه انگل و درنهایت نوع بیماری در برنامه ریزی های بهداشتی اهمیت بسزایی دارد(۲،۸).

با مشاهدات میکروسکوپی لامهای رنگ آمیزی شده با گیمسا می توان به وجود آلودگی وحضور انگل پی برد اما شناسایی دقیق گونه انگل امکان پذیر نمی باشد(۹،۱۰). روش های مولکولی درتشخیص بیماری لیشمانیوز و شناسایی گونه های انگل در سال های اخیر بسیار رواج یافته اند. از مزایای این روش ها این است که حتی با تعداد کم انگل نیز آلودگی را نشان داده و گونه انگل را مشخص می سازند. لذا میتوان با استخراج DNA از لامهای رنگ آمیزی شده با گیمسا وانجام واکنش های زنجیره ای پلیمرازی(PCR) انگل را تعیین هویت نمود(۱۰،۱۱).

جهت مطالعات مولکولی قسمت های مختلف ژنوم انگل لیشمانیا استفاده می شود(۱۱،۱۲).یکی از قسمتهای ژنوم که کاربرد زیادی دارد مربوط به ژن ریبوزوم (rDNA)می باشد که جهت تکثیر قطعهITS1 (Internal Transcribed Spacer1) استفاده می گردد.در این روش به علت یکسان بودن طول محصول PCR قطعاتITS1 برای گونه های لیشمانیاهای بیماریزای انسانی لازم است با تعیین توالی و یا روش PCR-RFLP انگل تعیین هویت گردد(۱۳،۱۴). تعیین توالی هزینه بالایی دارد و مستلزم ارسال نمونه ها به مراکز علمی پیشرفته می باشد که حصول جواب چندین روز طول می کشد.

اما روش PCR-RFLP محدودیت های ذکر شده را ندارد. اساس کار این روش به این صورت است که مقداری از محصول PCR نمونه ها را با آنزیم های قطع کننده (هضم کننده)واکنش میدهند. از آنجایی که توالی نوکلئوتیدهای DNA در گونه های مختلف انگل لیشمانیا یکسان نیست لذا الگوی حاصل از هضم DNA توسط آنزیم های محدود کننده یکسان نبوده ومنجر به پلی مورفیسم متمایز درحین الکتروفورز می گردد که برای هر گونه انگل لیشمانیا باند های خاصی مشاهده می گردد(۱۳،۱۵).

این مطالعه به منظور تعیین هویت انگل لیشمانیا با استفاده از تکنیک PCR-RFLP در لام های رنگ آمیزی شده مربوط به بیماران وجوندگان مخزن لیشمانیوز جلدی در شهرستان دامغان در سال ۱۳۸۷ صورت گرفته است.

روش کار:

این بررسی بر روی لام های رنگ آمیزی شده مربوط به زخم های انسانی و همچنین اسمیر های تهیه شده از جونده رومبومیس اپیموس که دارای انگل لیشمانیا بوده اند انجام گرفت.لام های انسانی از بیماران مشکوک به سالک که به مراکز بهداشتی درمانی مراجعه کرده بودند گرفته شد. جوندگان نیز از اطراف روستاهای آلوده صید شدند. لام ها پس از بررسی میکروسکوپی از نظر آلودگی به اجسام لیشمن، برای انجام آزمایشات مولکولی تحت فرایند استخراج DNA قرار گرفت. برای این کار از کیت مخصوص استخراجDNA از بافت(Bioneer,South Korea) استفاده شده است.

دراین مطالعه تعداد۲۵نمونه انسانی و ۸ نمونه ازجونده مورد آزمایش قرار گرفتند. برای تعیین هویت انگل از تکنیک Conventional PCR با برنامه حرارتی زیراستفاده شد(۱۳،۱۶).

1) Preheating: 95°C-5 min
2) Denaturation: 94°C-30 s
3) Annealing: 48°C-30 s
4) Extension: 72°C-1 min
5) Final Extension: 72°C-7 min
6) Repeat 2 to 4 step: 35 cycles

پرایمر های بکار رفته در این مطالعه شامل(LITSR(CTGGATCATTTTCCGATG و L5.8S(TGATACCACTTATCGCACTT) بودندکه قطعه ITS1 را در تمام گونه های لیشمانیا تکثیر می کنند(۱۳).

پس از انجامPCR، محصول بر روی ژل آگارز یک درصد

Archive of SID

www.SID.ir

حاوی اتیـدیوم بروماید الکتروفـورز شـد. سـپس بـر روی دستگاه ایلومیناتور از باندهای مشاهده شده عکس بـرداری شد. از آنجایی که با تکثیر ناحیهITS1 باند ایجاد شده برای تمام گونه های انگل لیشمانیا بین ۳۵۰bp-۳۰۰ می باشـد (۱۳،۱۶،۱۷) افتراق گونه ها غیرممکن خواهد بود لذا برای تعیین گونه انگل لیشمانیا از آنـزیم محدودکننـده HaeIII (معرفی شده توسط Dweik) جهتRFLP استفاده شد که توالیITS1 را در قسمت GG↓CC قطع می کند و در انگلهای لیشمانیا با توجه به تعداد نقطـه بـرش محلهـای مختلفـی قطع خواهند شدکه پس از الکتروفورز، محصول به صـورت باند های جداگانه بر روی ژل قابل رویت می باشد(۱۳).

برای انجام این واکنش به ازای هر ۲۵ µl از حجم واکنش، واکنشگرهای زیر با هم مخلوط شدند:

۱- محصول PCR تکثیر rDNA با کیفیت مناسب ۲۰ µl

۲- بافر مخصوص آنزیم ۲/۵ µl

۳- آنزیم محدودکنندهHaeIII به میزان۱µl(معادل۵ Unit)

۴- آب مقطر ۱/۵µl

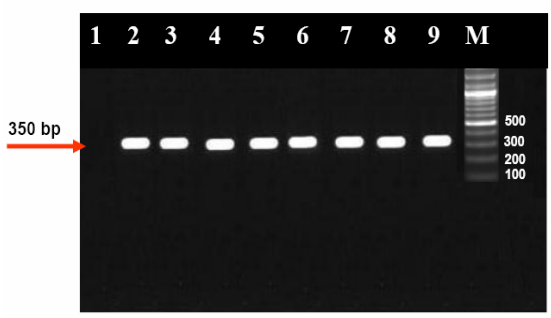
بعد از تهیه مخلوط اصلی آن را به مدت ۵ ثانیه با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ نموده وسپس ۱۰µl روغن معدنی(Mineral Oil) جهت جلوگیری از تبخیراجزایواکنش به آن اضافه شد.نمونه ها به مـدت ۸ سـاعت در انکوبـاتور ۳۷درجه سانتیگراد قرار گرفت.بعد از اتمام واکنش۱۰µl- ۵ از محـصول PCR-RFLP درکنـار مـارکر ژنتیکـی ۵۰bp (فرمنتاز) در ژل ۲/۵٪ الکترو فورز گردید.در نهایت بعـد از الکتروفورز از باندهای ایجاد شده عکس تهیه شد.

به منظور تعیین تـوالی نمونـه هـا، ۶۰µl از محـصول PCR دو نمونه انسانی و یک نمونه جونده مربوط به تکثیـر ژن هدف آماده و با همکـاری شـرکت آرمـین شـگرف بـه شرکت Seqlab کشور آلمان ارسـال گردیـد. ایـن شـرکت نتایج تعیین توالی نمونـه هـا را بـه صـورت کروماتوگراف وتوالی خطی ارائه نمود. جهت بررسی صـحت تـوالی هـا و تعیـین هویـت صـحیح آنهـا از نـرم افـزار BLAST (www.ncbi.nih.gov.org/blast) استفاده شد.

جایگاه های بـرش آنـزیمHaeIII بـرروی تـوالی هـای بدست آمده وهمچنین توالی نمونه هـای کنتـرل آزمـایش شدند. این بررسی با استفاده از نرم افـــــزاری به نـــام Nebcuter(http:/tools.neb.com/ nebcuter) انجام شـد و در نقشه فیزیکی قطعه تعیین تـوالی شـده محـل بـرش آنزیمی روی مولکول DNA مشخص شد.

نتایج:

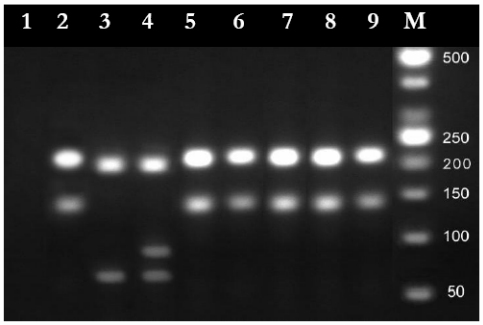
بررسی میکروسـکوپی ۲۵نمونـه انـسانی و۸ نمونـه از جونده رومبـومیس اپیمـوس نـشان داد کـه همگـی دارای انگل لیشمانیا بوده اند. نمونـه هـا مـورد آزمـایش واکـنش زنجیره ای پلیمرازی قرار گرفتند، پس از انجام الکتروفـورز مشخص شد که باند های ایجاد شـده درمحـدوده ۳۵۰bp می باشند(تصویر ۱).



تصویر ۱: الکتروفورز محصول PCR ژن ITS1

ستون ۱: کنتـرل منفـی ؛ ستون ۲: لیـشمانیا مـاژور اسـتاندارد (MHOM/ IR/75/ER) ؛ ستون۳: لیـشمانیا تروپیکـا اسـتاندارد (MHOM/IR/99) ؛ ستون۴: لیـشمانیا اینفـانتوم اسـتاندارد (MCAN/IR/97/LON49) ؛ سـتون های۷- ۵: نمونه های انسانی ؛ سـتون هـای ۸ و۹: نمونـه هـای جونـده وM : نشانگر ۱۰۰ جفت بازیFermentas

پس از واکنش RFLP وانجام الکتروفورز مشخص شـد کـه باند های ایجاد شده در نمونه های انـسانی و نمونـه هـای جونده مشابه باندهای لیشمانیا ماژوراستاندارد مـی باشـند که به صورت دوباند ۲۲۰ bp و ۱۴۰bp مشاهده شـده انـد در صورتیکه باند ایجـاد شـده بـرای نمونـه هـای کنتـرل لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا اینفانتوم متفاوت بـا لیـشمانیا ماژور بوده است(تصویر ۲).



تصویر ۲: الکتروفورز محصول PCR-RFLP ژن ITS1

ستون ۱: کنتـرل منفـی ؛ ستون ۲: لیـشمانیا مـاژور اسـتاندارد (MHOM/ IR/75/ER) ؛ ستون۳: لیـشمانیا تروپیکـا اسـتاندارد(MHOM/IR/99) ؛ ستون۴: لیـشمانیا اینفـانتوم اسـتاندارد (MCAN/IR/97/LON49) ؛ ستون های۷- ۵: نمونه های انسانی؛ ستون های ۸ و۹: نمونه هایجونده وM : نشانگر ۵۰ جفت بازیFermentas

Archive of SID

www.SID.ir

پس از تعیین توالی و تشخیص هویت نمونه ها با استفاده از نرم افزارBLASTمشخص شد که هرسه مورد از انگل های تعیین توالی شده مربوط به گونه انگل لیشمانیا ماژور بوده است. توالی ژنی قطعه ITS1 انگل های جداشده در بانک جهانی ژن ثبت شده اند که با شماره دسترسی GQ466350 مربوط به نمونه جونده و2-GQ466351 مربوط به نمونه های انسان قابل رویت می باشند.

بررسی جایگاه های برش آنزیم HaeIII برروی توالی نمونه های این مطالعه و همچنین توالی نمونه های کنترل مثبت نشان داد که انگل لیشمانیا ماژور دارای یک نقطه برش ، لیشمانیا اینفانتوم دارای دو نقطه برش و لیشمانیا تروپیکا دارای سه نقطه برش می باشد. لذا باند های۲۲۰ bp و ۱۴۰bp برای لیشمانیا ماژور و باندهای ۶۰ bp وbp ۸۰ و ۲۰۰bp برای لیشمانیا اینفانتوم قابل مشاهده هستند. باتوجه به جایگاه های برش آنزیم بر روی توالی لیشمانیا تروپیکا انتظار باند هایbp ۲۰، ۵۵، ۶۴، ۲۰۰ را خواهیم داشت اما به علت کوچک بودن قطعه bp ۲۰ و همپوشانی دو قطعه ی bp ۵۵ وbp ۶۴ که وزن مولکولی نزدیکی دارند فقط دو باند در محدوده bp ۲۰۰ وbp ۶۰ قابل رویت هستند.باندهای ایجاد شده برای هرسه گونه در تصویر شماره ۲ نشان داده شده است.

بحث:

شناسایی جنبه های اپیدمیولوژیک بیماری لیشمانیوز جلدی جهت ارائه برنامه کنترل ضرورت دارد. در این خصوص شناسایی انگل عامل بیماری اهمیت بالایی دارد چرا که مشخص کننده نوع بیماری در یک منطقه خواهد بود(۱۸).تشخیص دقیق گونه انگلهای لیشمانیا با مشاهده میکروسکوپی لام های رنگ آمیزی شده با گیمسا امکان پذیر نیست و برای تشخیص گونه نیاز به جداسازی انگل،کشت آن وتزریق به حیوان حساس آزمایشگاهی ویا استفاده از روش ایزوآنزیم می باشد که انجام آنها وقت گیر و پرهزینه بوده ومستلزم تکثیر انگل به تعداد زیاد می باشد(۱۹). روشهای متکی بر DNA از جمله PCR که جهت تشخیص بیماری لیشمانیوز درسالهای اخیر بسیار از آن استفاده می شود،محدودیت های فوق را نداشته و با مقدار کمی ازDNA بافت آلوده می توان وجود آلودگی، گونه انگل ونوع بیماری را تشخیص داد(۱۰،۱۱،۱۳،۱۹).

این مطالعه یک بررسی جهت تعیین هویت انگل لیشمانیا در انسان وجوندگان مخزن بیماری لیشمانیوز در شهرستان دامغان بوده است که در این بررسی ابتدا برای کلیه نمونه های مطالعه و نمونه های استاندارد به منظور تکثیر ناحیه ITS1 واکنش های زنجیره ای پلیمرازی (PCR) انجام شد. پس از رویت باندهای ایجاد شده مشخص شد که برای نمونه های مطالعه حاضر و نمونه های استاندارد که از گونه های مختلفی بوده اند باندهایی در محدوده bp ۳۵۰ تشکیل شده است که جهت تعیین گونه کمکی نکرده است. لذا از روش RFLP جهت تمایز گونه ها استفاده شده است که نشان داد روش بسیار خوبی جهت تشخیص گونه های لیشمانیای ایجاد کننده بیماری در ایران است، به طوریکه با مشاهده پلی مورفیسم ایجاد شده در اثر هضم آنزیمی که برای هر گونه اختصاصی است می توان به نوع انگل پی برد. پس از الکتروفورز محصولات واکنشRFLP مشخص شد که باند های ایجاد شده برای نمونه های انسانی وجونده مشابه هم بوده و برای آنها دو باند در محدوده bp ۲۲۰ و bp۱۴۰ مشاهده شده که مطابق با باند های ایجاد شده برای انگل لیشمانیا ماژور استاندارد بوده است که می توان نتیجه گیری کردکه انگل لیشمانیا ماژور در لام های رنگ آمیزی شده با گیمسا حضور داشته اند. به عبارتی افراد بیمار وجونده رومبومیس اپیموس به این انگل آلوده بوده اند.این انگل عامل لیشمانیوز جلدی نوع روستایی است و در بسیاری از کانونهای لیشمانیوز ایران انتشار دارد(۲،۲۰،۲۱).

هرچندکه این روش در مطالعات دیگر تائید شده است اما در این بررسی به منظور اطمینان بیشتر سه نمونه تعیین توالی شده اند که با نتایج روشRFLP همخوانی داشته است. روش PCR-RFLP می تواند روش بسیار مناسبی به منظور تعیین گونه باشد وبا استفاده از این روش در وقت وهزینه صرفه جویی به عمل می آید به طوری که دیگر نیاز به مقدار زیاد محصول PCR و همچنین تعیین توالی نمی باشد.

مخزن بیماری در این مطالعه جونده رومبومیس اپیموس تشخیص داده شده است.این گونه در مناطق مرکزی وشمال شرقی ایران به عنوان مخزن اصلی بیماری لیشمانیوز جلدی روستایی معرفی شده است(۲،۲۲). حضور جونده رومبومیس اپیموس با وفورنسبتاً بالا در فاصله بسیار نزدیک با روستاها وتوسعه فعالیت های کشاورزی درمنطقه به بومی شدن بیماری در منطقه کمک کرده است. لذا جهت کاهش بروز بیماری کنترل جوندگان همواره می بایست مد نظر قرار گیرد.

Archive of SID

www.SID.ir

نتیجه نهایی:

تعیین هویت انگل لیشمانیا با استفاده از تکنیک PCR-RFLP در لام های رنگ آمیزی شده با گیمسا یک روش دقیق و مفیدی می باشد که می توان از آن در سایر کانون های لیشمانیوز کشور استفاده کرد.یکی از مزایای این روش این است که می توان گونه های ایجاد کننده بیماری در ایران را بدون انجام تعیین توالی تشخیص داد. در این روش نیازی به کشت انگل و یا تزریق به حیوانات حساس آزمایشگاهی نخواهد بود و می توان مستقیماً از روی لام رنگ آمیزی شده جهت تعیین هویت اقدام نمود.

سپاسگزاری:

این تحقیق درقالب پایان نامه دانشجویی کارشناسی ارشد رشته حشره شناسی پزشکی ومبارزه با ناقلین و همچنین طرح تحقیقاتی مشترک بین دانشگاه علوم پزشکی تهران وسمنان با کد ۶۷۳۰ مورخ۱۳۸۶/۱۰/۲۹ انجام شده است. درپایان از مسئولین وکارکنان دانشگاه علوم پزشکی تهران و مرکز بهداشت شهرستان دامغان قدردانی می گردد.

منابع :

1. Bates PA. Transmission of leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. Int J Parasitol 2007; 37(10): 1097–1106.
2. Ardahali S, Rezaei H, Nadim A. [Leishmania and leishmaniasis]. 2nd ed. Tehran: Nashre Daneshgahi Center , 1994. (Persian)
3. Leishmaniasis. Report of the Scientific Working Group on Leishmaniasis, meeting report. 2-4 February 2004, Geneva, Switzerland. Available from: http://apps.who.int/tdr/svc/publications/tdr-research-publications/swg-report-leishmaniasis
4. Piscopo TV, Mallia Azzopardi C. Leishmaniasis. Postgrad Med J 2007; 83: 649-657.
5. Mohebali M. [Zoonotic protozoa diseases]. Tehran: Nadi , 1996:60. (Persian)
6. Rassi Y ,Hanafi bojd AA. [Sand fly, the vector of leishmaniasis]. Tehran: Noavaran Elm, 2006. (Persian)
7. Nadim A, Seyedi-Rashti MA, Mesghali A. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Iran. B. Khorassan. Part IV. Distribution of sandflies. Bull Soc Path Exot 1971;64(6): 865 – 870.
8. Killick-Kendrick R. The biology and control of phlebotominae sand flies. Med Vet Entomol 1999; 17: 279-289.
9. Aransay AM, Scoulica E, Tselentis Y. Detection and identification of leishmania DNA within naturally infected sand fleis by semi-nested PCR on minicircle kinetoplast DNA. Appl Environ Microbiol 2000;66(5):1933-38
10. Singh S. New developments in diagnosis of leishmaniasis.Indian J Med Res 2006;123:311-30.
11. Alvar J, Baker JR. Molecular tools for epidemiological studies and diagnosis of leshmaniasis and selected other parasitic disease. Trans R Soc Trop Med Hyg 2002;96(Supp1 1):S1-S250.
12. Banuls AL, Hide M, Prugnolle F. Leishmania and the leishmaniases: A parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. Adv Parasitol 2007; 64: 1-109
13. Dweik A, Schönian G, Mosleh IM, Karanis P. Evaluation of PCR-RFLP (based on ITS-1 and HaeIII) for the detection of eishmania species, using Greek canine isolates and Jordanian clinical material. Ann Trop Med Parasitol 2007; 101 (5):399-407.
14. El Tai NO , Osman 0F , Fari M El , Presber W, Schonian G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of leishmania donovani spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. Trans R Soc Trop Med Hyg 2000;94(5):575-79
15. Marfurt J, Neiederwiwieser I, Makia ND, Beck HP, Felger I. Diagnostic genotyping of old and new world leishmania soecies by PCR- RFLP. Parasitology 2003; 46: 115-124.
16. Kazemi-rad E, Mohebali M, Hajaran H, Rezaei S, Mamishi S. Diagnosis and characterization of leishmania species in giemsa-stained slides by PCR-RFLP. Iranian J Public Health 2008;37(1): 54-60
17. Hajjaran H, Mohebali M, Alimoradi S, Abai MR, Edrissian GH. Isolation and characterization of pathogenic leishmania turanica from nesokia indica (Rodentia, Muridae) by PCR-RFLP and ITS1 sequencing in Iran. Trans R Soc Trop Med Hyg 2009;103(11):1177-9.
18. World Health Organization. Control of the leishmaniasis, technical, report.1990;18:793
19. Schonian G Nasereddin A Dinse N. PCR diagnosis and characterization of leishmania in local and imported clinical samples. Diag Microbiol Infect Dis 2003;47: 349-58.
20. Rassi Y, Javadian E, Amin M, Rafizadeh S, Vatandoost H, Motazedian H. Meriones libycus is the main reservoir of zoonotic cutaneous leishmaniasis in south of Islamic Republic of Iran. East Mediterr Health J 2006;12(3-4):474-7.
21. Rassi Y, Sofizadeh A, Abai MR, Oshaghi MA, Rafizadeh S, Mohebail M, et al. Molecular detection of leishmania major in the vectors and reservoir hosts of cutaneous leishmaniasis in Kalaleh district, Golestan province, Iran. Iranian J Arthropod-Borne Dis 2008; 2(2) : 21-27.
22. Yaghoobi-Ershadi MR. [Study of current statue of cutaneous leishmanisis epidemiology in parts of Isfahan focuses for design and proposal control programme]. Medical entomology PhD Thesis. Health school, Tehran University of Medical Sciences, 1994. (Persian)

Archive of SID

www.SID.ir