مقاله پژوهشی

بررسی پشه های خاکی به عنوان ناقلین لیشمانیوز جلدی با استفاده از روش Nested PCR در مناطق روستایی شهرستان دامغان، استان سمنان

دکتر یاور راثی* ، صادق محمدی ازنی ، دکتر محمدعلی عشاقی*** ، دکتر محمدرضا یعقوبی ارشادی***
دکتر مهدی محبعلی****، محمدرضا عبایی*****، فاطمه محترمی*****، زینب نوکنده******
سینا رفیع زاده*******

دریافت : ۹۰/۲/۱۲ ، پذیرش : ۹۰/۸/۲

چکیده:

مقدمه و هدف: لیشمانیوز توسط تک یاخته اجباری داخل سلولی از جنس لیشمانیا ایجاد می شود.این بیماری در بیش از نیمی از استانهای کشورایران گزارش شده است. ناقلین بیماری گونه های مختلفی از پشه خاکی ها هستند.شناسایی ناقلین بیماری وداشتن اطلاعات کافی در خصوص آنها جهت اجرای برنامه کنترل اهمیت بسزایی دارد.

روش کار: این مطالعه توصیفی ـ مقطعی در سال ۱۳۸۷ در شهرستان دامغان انجام شده است.ازابتدای فروردین لغایت پایان آبان پشه خاکی ها هر ۱۵ روز یکبار بوسیله تله های چسبان از اماکن داخلی و خارجی صید شده اند. سر و دو بند انتهایی پشه خاکی ها جدا و با استفاده از پوری روی لام مونته وتعیین هویت شده اند. سایر قسمت های بدن جهت جستجوی انگل لیشمانیا در فرایند استخراج DNA قرار گرفته و با استفاده از پرایمرهای اختصاصیkinetoplast DNA با روش Nested PCR آزمایش شده اند.

نتایج: مجموعاً ۶۱۱۰ پشه خاکی از۸ گونه مختلف صید شده اند.بیشترین وفور مربوط به فلبوتوموس پاپاتاسی بوده است (۴۶/۷٪). آزمایشات مولکولی ۲۸۰ پشه خاکی جهت تعیین آلودگی نشان داد که تعداد ۲۸ پشه خاکی(۱۰٪) آلوده به انگل لیشمانیا ماژور بوده اند که۲۴پشه، فلبوتوموس پاپاتاسی(۸۵/۷٪) و۴پشه فلبوتوموس کوکازیکوس(۱۴/۳٪) بوده است. بالاترین میزان آلودگی پشه خاکی ها از لانه جوندگان (۴۲/۹٪) بوده است. آلودگی پشه خاکی ها در شهریور ماه بیشتر از ماههای دیگر بوده است(۸۹/۳٪).

نتیجه نهایی: وفور بالای پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی وآلودگی آن به انگل لیشمانیا ماژور ثابت می کند که این گونه ناقل اصلی و قطعی می باشد. آلودگی فلبوتوموس کوکازیکوس به انگل لیشمانیا ماژور در لانه جوندگان نیز نشان می دهد این گونه به عنوان ناقل ثانویه در بین جوندگان نقش دارد. بیشترین آلودگی پشه خاکی ها در شهریورماه بوده لذا رعایت حفاظت شخصی در این ماه اهمیت بیشتری دارد.با توجه به وفور ناقلین و آلودگی بالای آنها انجام اقداماتی جهت کاهش وفور پشه خاکی ها وکاهش گزش انسان توصیه می شود.

کلید واژه ها: فلبوتوموس پاپاتاسی / لیشمانیوز جلدی / لیشمانیا ماژور / واکنش زنجیره ای پلیمراز

مقدمه :

لیشمانیوز یکی از بیماریهای مشترک بین انسان وحیوان می باشد که سازمان بهداشت جهانی آن را جزء هشت بیماری مهم انگلی مناطق گرمسیری دنیا معرفی کرده است(۱،۲). در سالهای اخیر پراکندگی این بیماری از مرز ۸۸ کشور گذشته و حدود ۳۵۰ میلیون نفر در معرض

* استاد گروه حشره شناسی پزشکی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
** کارشناس ارشد حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین دانشگاه علوم پزشکی سمنان(sadegh_azni@yahoo.com)
*** دانشیار گروه حشره شناسی پزشکی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
**** استاد گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
***** عضو هیأت علمی گروه حشره شناسی پزشکی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
****** کارشناس میکروبیولوژی مرکز بهداشت شهرستان دامغان
******* کارشناس اداره سوانح و حوادث وزارت بهداشت

Archive of SID
www.SID.ir

ابتلا قرار دارند. سالیانه ۹۰٪ ازموارد لیشمانیوز جلدی جهان از کشورهای افغانستان، برزیل، ایران، پرو، عربستان ، سوریه، الجزایر و سودان گزارش می شود(۳،۴). لیشمانیوز جلدی به دو فرم شهری وروستایی در ایران وجود دارد. در نوع شهری یاAnthroponotic Cutaneous Leishmaniasis عامل بیماری لیشمانیا تروپیکا، ناقل آن پشه خاکی فلبوتوموس سرژانتی ومخزن اصلی بیماری انسان می باشد. امادرنوع روستایی یاZoonotic Cutaneous Leishmaniasis که مخزن بیماری جوندگان هستند،ناقل بیماری فلبوتوموس پاپاتاسی و عامل آن لیشمانیا ماژور می باشد(۱،۲،۵).

بیماری لیشمانیوز جلدی از گذشته های دور در کشور ایران وجود داشته و سالانه حدود بیست هزار مورد بیماری گزارش می شود ولی احتمالاً موارد حقیقی بیش از ۴ تا ۵ برابر آن است (۶). هرساله مواردی از بیماری از استان سمنان گزارش می شود که بیشترین بروز آن مربوط به شهرستان دامغان می باشد. این بیماری در سال ۱۳۷۸ در مناطق روستایی این شهرستان به صورت اپیدمی بروز پیدا کرده است و پس از آن هر ساله تعداد زیادی از افراد به آن مبتلا می گردند(۷).

به منظور اجرای تدابیر کنترلی جهت کاهش بروز بیماری ، شناسایی ناقلین بیماری ومیزان آلودگی آنها و پیک آلودگی در ماههای سال اهمیت زیادی دارد. یافتن پشه خاکی آلوده به انگل،گامی اساسی در شناسایی گونه های ناقل و نیز پتانسیل انتقال بیماری در مناطق بومی است(۸). روش های مرسوم جهت تعیین ناقلین لیشمانیوز تشریح پشه خاکی ها ، مشاهده انگل در زیر میکروسکوپ ودر نهایت تزریق به حیوان حساس آزمایشگاهی و یا کشت انگل می باشد. روش های فوق وقت گیر وسخت بوده ونیاز به تجربه و مهارت بالا داشته و دارای محدودیت هایی نظیر آلودگی محیط کشت هستند و همچنین جهت تعیین هویت انگل جدا شده نیاز به روش های تکمیلی نظیرایزوآنزیم ها ویا روش های مولکولی می باشد(۹).

روش های مولکولی مبتنی بر PCR مشکلات و محدودیت های فوق را ندارند(۱۰،۱۱). قسمت های مختلف ژنوم انگل لیشمانیا در جهت تشخیص آلودگی ناقلین لیشمانیوز استفاده می شود(۱۲). یکی از قسمتهایی که کاربرد فراوان دارد minicircle kDNA بوده که مربوط به کینتوپلاست انگل می باشدو به تعداد ده هزار کپی در هر سلول انگل لیشمانیا وجود دارد.لذا تکثیر این قسمت در PCR جهت تشخیص آلودگی ناقلین کارایی بالایی دارد و در مواردی که تعداد انگل در بدن پشه خاکی کم باشد نیز مفید است،بطوریکه با استفاده از پرایمر های اختصاصی می توان علاوه بر تشخیص آلودگی به انگل لیشمانیا، گونه آن را مشخص نمود(۹،۱۳).

با توجه به اینکه جهت تعیین ناقلین لیشمانیوز جلدی در شهرستان دامغان مطالعاتی صورت نگرفته لذا این مطالعه به منظور شناسایی ناقلین بیماری با استفاده از پرایمر های اختصاصی طراحی شده توسط Noyes و همکارانش با روشNested PCR انجام شده است(۱۴).

روش کار:

الف: صید پشه خاکی : در این مطالعه توصیفی ـ مقطعی صید پشه خاکی از اماکن داخلی، خارجی ولانه جوندگان از فروردین لغایت پایان آبان ماه ۱۳۸۷ در ۱۱ روستای شهرستان دامغان صورت گرفته است. هر ۱۵ روز یکبار صید پشه خاکی با ۲۱۰ تله چسبان انجام شده است. تله ها یک ساعت قبل از غروب آفتاب در اماکن مورد نظر نصب شده و در صبح روز بعد، قبل از طلوع آفتاب جمع آوری می شد. پشه خاکی های صید شده پس از انتقال به آزمایشگاه با استفاده از سوزن حشره شناسی ویا قلم مو از تله ها جدا شده است. سپس با استفاده از اتانول ۹۶ درجه چندین بار شستشو داده می شد تا روغن آنها گرفته شود. با استفاده از دو سوزن تشریح سر و دو بند انتهایی بدن پشه های ماده در زیر دستگاه لوپ جدا و با استفاده از محیط پوری بر روی لام فیکس شدند تا با استفاده از کلید تشخیص معتبر تعیین گونه انجام گردد(۱۵). بقیه بدن پشه خاکی جهت انجام آزمایشات مولکولی واستخراج DNA داخل تیوپهای اپندورف حاوی الکل ۹۶ درجه قرار داده شد.اطلاعات مربوط به پشه خاکی های صید شده در فرم های مخصوص ثبت شده و در نهایت تجزیه وتحلیل گردیدند.

ب: استخراج DNA پشه خاکی ها و واکنش PCR : استخراج DNA از ۲۸۰پشه خاکی ماده ی گونه های صید شده از جنس فلبوتوموس در طی ماههای مطالعه به روش Ish-Horowicz انجام شد(۱۶).جهت خشک شدن آب و الکل موجود در نمونه ها درب تیوب های حاوی نمونه پشه

Archive of SID

www.SID.ir

خاکی ماده به مدت ۱۲ ساعت در شرایط آزمایشگاهی بـاز ماند. سپس نمونه ها بوسیله میله های شیشه ای اسـتریل کاملاً خرد و همگن شدند. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتـر Grinding mix اضافه شد. سپس ۱۰ میکرولیتر محلـول SDS به نمونه افزوده شد و مدت ۳۰ دقیقه در بـن مـاری ۶۵ درجـه سـانتیگراد قـرار داده شـد. در مرحلـه بعـد۳۰ میکرولیتر محلول استات پتاسیم ۸ مولار اضافه گردید. بعد از سانتریفیوژ نمودن به مدت۳ ثانیه با دور rpm ۱۳۰۰۰ ، نمونه ها به مدت ۴۵ دقیقه بر روی یخ قرار گرفته وسـپس به تیوب های جدید انتقال داده شدند. در ایـن مرحلـه بـه نمونه هـا ۳۵۰ میکرولیتـر اتـانول۹۶٪ افـزوده و در دمـای ۲۰- درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شـدند. بعد از این مرحلـه نمونـه هـا بـه مـدت۳۰ دقیقـه بـا دور rpm۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شده ومحلـول بـالایی تیـوب دور ریخته شد. بعد از خشک شـدن، نمونـه هـا بـا اسـتفاده از ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۵٪ شستشو داده شدند. در پایـان ۲۰ میکرولیتر TE bufferبه تیـوب هـا اضـافه و در دمـای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شده اند تا DNA استخراج شده جهت انجام PCR مورد استفاده قرار گیرد.

تمامی مواد مورد نیاز جهت استخراج DNA از شرکت Roche آلمان تهیه گردید. ترکیب محلولهای استفاده شده در فرایند استخراج DNA در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱: محلولهای مورد استفاده و ترکیبات سازنده آنها در فرایند استخراج DNA

نام محلول	ترکیبات سازنده
Grinding mix	500 µL 10X grinding buffer(0.1M Tris-HCl Ph= 7.5; 0.6M NaCl; 0.1 M EDTA) 250 µL spermine/spermidine(3mM spermine, 3mM spermidine) 2.5 ml sucrose10% 1.75 ml ddH2O
SDS mix	1.8ml 2X SDS buffer(0.8M Tris-HCl Ph=9 ;0.27M EDTA) 2.5ml sucrose 600 µL SDS 10% 17 µL diethl pyrocarbonate
TE buffer	10mM Tris-HCl Ph=8 ; 1mM EDTA Ph= 8

در این مطالعه، برای تشخیص گونه انگل از روش حـساس Nested PCR اسـتفاده گردیـد کـه واکـنش زنجیـره ای پلیمرازی دو مرحله ای می باشد که در مرحله اول، قطعه ای بزرگ از ژنوم هدف تکثیر شـده و در مرحلـه دوم بـا کمـک محصول اولیه قطعـه ای کوچـک تـر از روی قطعـه بزرگتـر ساخته می شود.برای این کار از پرایمرهای طراحی شـده توسط Noyes استفاده شد(۱۴). این پرایمرها براساس ناحیه حفاظت شده حلقـه هـای کوچـک kDNA (Minicircle) طراحی شده و برای انگلهای L.infantum و L.donovani محصول PCR به طـول bp ۶۸۰، بـرای انگـل L.tropica طـول بانـد bp ۷۵۰ و بـرای انگـل L.major طـول باند bp ۵۶۰ ایجاد می نماید.

مواد لازم برای مرحله اول PCR برای هر نمونه شـامل موارد ذیل بوده است که تمـامی آنهـا از شـرکت سـیناژن ایران تهیه شده است: Taq DNA Polymerase بـه میـزان ۰/۷۵ میکرولیتـر، بازهـای دئوکـسی نوکلئوتیـد۲/۵میلـی مول،کلرومنیزیوم دو میلی مول، بافرPCR ۲/۵میکرولیتـر ومیزان ۷-۲ میکرولیتر DNA پشه خـاکی و۴۰ نـانوگرم از آغازگرهای

CSB2XF(C/GA/GTA/GCAGAAAC/TCCCGTTCA) و

CSB1XR (ATTTTTCG/CGA/TTTT/CGCAGAACG)

حجم کل واکنش را با اضافه کردن مقدار مناسـب ddH_2O بـه ۲۰ میکرولیتـر رسـانده مـی شـد و در دسـتگاه Thermocycler با مشخصات Ependorf مـدل Personal برنامه حرارتی زیر جهت تکثیر قطعه خالصDNA استفاده شد:

مرحله اول: دمایC°۹۴ به مدت ۵ دقیقه
مرحله دوم که ۳۰ بار تکـرار گردیـد: ۱- دمـایC°۹۴ بـه مـدت ۳۰ ثانیـه. ۲- دمـایC°۵۵ بـه مـدت ۱ دقیقـه. ۳- دمایC°۷۲ به مدت ۹۰ ثانیه.

از محصول PCR به دست آمده در این مرحله بـرای PCR مرحله دوم استفاده شده است، بـدین صـورت کـه مقـدار ۱میکرولیتر از محصول مرحله اول را با۹ میکرولیترddH_2O مخلوط کرده و از ایـن مخلـوط مقـدار۲میکرولیتـر جهـت مرحلـه دوم PCR اسـتفاده شـد. آغازگرهـای ایـن مرحله 13Z (ACTGGGGGTTGGTGTAAAATAG) و LIR (TCGCAGAACGCCCCT) بوده اند. سایر مـواد بکار رفته همانند مرحله اول بود. حجم نهایی واکنش را بـا اضـافه کـردن مقـدار مناسـب ddH_2O بـه۳۰ میکرولیتـر رسانده و برنامهPCR همانند مرحله اول اجرا شد.

پس انجام مرحله دوم Nested PCR ، محصول واکـنش آن بر روی ژل آگارز یک درصـد حـاوی اتیـدیوم بروماید الکتروفورز شـده انـد.سـپس بـر روی دسـتگاه ایلومینـاتور گذاشته و در صـــورت مشاهـــده باندهایDNA ، از آن

Archive of SID

www.SID.ir

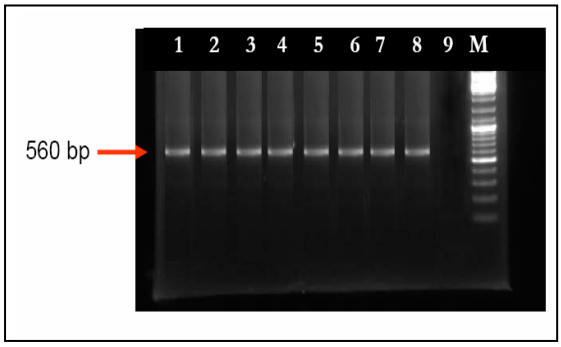
عکسبرداری شد و گونه انگل با توجه به شاخص وزنی محصولات PCR تشخیص داده شد.

نتایج:

در طی مطالعه مجموعاً ۶۱۱۰ پشه خاکی صید شده اند که مربوط به گونه های فلبوتوموس پاپاتاسی (۴۶/۷٪)، گروه فلبوتوموس کوکازیکوس(۱۹٪)، فلبوتوموس سرژنتی (۰/۳٪) ، فلبوتوموس الکساندری (۰/۰۳٪) ، فلبوتوموس انصاری(۰/۳٪) ، سرژانتومیا سینتونی (۳۱/۵٪)، سرژانتومیا سامبوریکا(۲/۲٪) بوده اند.

فعالیت این پشه خاکی ها از اوایل اردیبهشت شروع شده وبا دو نقطه اوج فعالیت (یکی در اوایل خرداد ماه و دیگری در اواسط شهریورماه) در اواخر مهرماه خاتمه یافت. بالاترین وفور در اماکن داخلی ، خارجی و لانه جوندگان مربوط به گونه فلبوتوموس پاپاتاسی بوده است.

پس از آزمایشات PCR تعداد ۲۸۰ پشه خاکی و الکتروفورز محصولات مرحله دوم Nested PCR ، نتایج از این قرار بود که در نمونه های ۲۸ پشه خاکی(۱۰٪) باندهای مشاهده شده ۵۶۰bp بوده است که نشان دهنده آلودگی به انگل لیشمانیا ماژور می باشد. ۲۴ پشه خاکی از گونه فلبوتوموس پاپاتاسی(۸۵/۷٪) و۴پشه فلبوتوموس کوکازیکوس(۱۴/۳٪) بوده است (تصویر ۱).



تصویر ۱ : الکتروفورز محصول PCR تکثیر kDNA

ستون ۵-۱ انگل لیشمانیا ماژور جدا شده از فلبوتوموس پاپاتاسی؛ ستون۷ و۶ : انگل لیشمانیا ماژور جدا شده از فلبوتوموس کوکازیکوس؛ ستون ۸: لیشمانیا ماژور استاندارد(MHOM/IR/54/LV39)، ستون ۹: کنترل منفی وM : نشانگر ۱۰۰ جفت بازی سیناژن

از نظر محل صید این پشه خاکی های آلوده ۱۲عدد(۴۲/۹٪)از لانه جوندگان ،۹ عدد(۳۲/۱٪) از اماکن خارجی و۷ پشه خاکی(۲۵٪) از اماکن داخلی بوده است. از بین پشه خاکی های آلوده تعداد ۳ عدد (۱۰/۷٪)در نیمه دوم مرداد،۱۳عدد(۴۶/۴٪) در نیمه اول شهریور و۱۲عدد (۴۲/۹٪) در نیمه دوم شهریور صید شده اند.

بحث:

نتایج مطالعه حاضر نشان داد استفاده از این روش در مقایسه با روش ایزوآنزیم بسیار سریع و حساس می باشد چرا که نیاز به تشریح تک تک پشه خاکی ها نبوده و محدودیت های روش ایزوآنزیمی را ندارد لذا روش Nested PCR با استفاده از پرایمر های طراحی شده توسط Noyesعلاوه بر تعیین ناقلین، در مطالعات مخازن بیماری و عفونت انسانی نیز توصیه می شود.

در طی این مطالعه ۸ گونه پشه خاکی صید شدند که نشان از تنوع پشه خاکی ها در شهرستان دامغان دارد. فلبوتوموس پاپاتاسی گونه غالب منطقه بوده ودارای بالاترین وفور در اماکن داخلی ، خارجی و لانه جوندگان بوده است. بطوریکه ۵۳/۵٪ از پشه خاکی ها در اماکن داخلی و ۴۳/۱٪ پشه خاکی های اماکن خارجی این گونه بوده است،که با مطالعات دیگر همخوانی دارد(۲،۱۷،۱۸). با توجه به وفور بالای پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی(۴۶/۷٪) و آلودگی آن در اماکن داخلی،خارجی ولانه جوندگان به انگل لیشمانیا ماژور (به میزان ۱۱٪) به نظر می رسد که این گونه ناقل قطعی و اصلی بیماری در منطقه باشد. این گونه در سایر کانونهای لیشمانیوز جلدی روستایی کشورمان نیز گونه غالب بوده و به عنوان ناقل قطعی معرفی شده است(۲۳-۱۹).

نظر به اینکه آلودگی این گونه در اماکن داخلی و لانه جوندگان به اثبات رسیده است لذا این گونه همانند سایر کانونهای کشورمان علاوه بر انتقال بیماری به انسان ، به عنوان ناقل بین جوندگان بوده وباعث حفظ چرخه وحشی بیماری می شود(۲،۲۴).

صید پشه خاکی فلبوتوموس کوکازیکوس آلوده به انگل لیشمانیا ماژور نشان می دهد با توجه به وفور آن در لانه جوندگان این گونه نیز در کنار فلبوتوموس پاپاتاسی در انتقال بیماری در بین جوندگان نقش دارد.این گونه در سایر کانونهایZCL کشورمان به عنوان ناقل در بین جوندگان در سیکل طبیعی بیماری گزارش شده است(۱۹،۲۵).

با توجه به اینکه انگل جدا شده از ناقلین لیشمانیا ماژور بوده است بنابراین نوع بیماری در منطقه روستایی یا ZCL می باشد(۱،۲) و در این نوع بیماری جوندگان مخزن بیماری هستند لذا مطالعاتی جامع جهت تعیین مخزن یا مخازن بیماری ضروری است (۲۸-۲۶ ،۱).

Archive of SID
www.SID.ir

بالاترین آلودگی فلبوتوموس پاپاتاسی در شهریور ماه بوده است که مطابق با پیک دوم فعالیت این پشه می باشد و ظاهراً بیشترین انتقال بیماری در این ماه صورت می گیرد لذا پیشنهاد می گردد در این ماه حفاظت شخصی جهت جلوگیری از گزش پشه خاکی بیشتر از ماههای دیگر رعایت شود(۸،۲۷،۲۹).

۷۵٪ پشه خاکی های آلوده از اماکن خارجی ولانه جوندگان صید شده اند بنابراین بیشترین گزش درخارج از اماکن انسانی صورت می گیرد.لذا توصیه می گردد مردم مناطق آلوده در هنگام فعالیت پشه خاکی ها درغروب وشب در موارد غیرضرور از منازل خارج نشوند.کشاورزان ،کارگران وسربازان که اجباراً می بایست درهنگام فعالیت پشه خاکی ها در اماکن خارجی حضور یابند باید پوشش کافی داشته واز مواد دافع حشرات به منظور جلوگیری از گزش استفاده نمایند.در منازل نیز توری ها و پشه بند های آغشته به سم جهت پیشگیری از بیماری توصیه می شود (۳۱-۲۷).

درپایان اقداماتی دیگر جهت کاهش وفور پشه خاکی از قبیل بهسازی محیط، دفع صحیح زباله و فاضلاب، دورکردن محلهای زندگی دام از اماکن انسانی توصیه می شود(۲۹،۳۰).

نتیجه نهایی:

باتوجه به نتایج این مطالعه به نظر می رسد پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی ناقل اصلی و قطعی بیماری در منطقه بوده که فعالیت این پشه خاکی از اوایل اردیبهشت شروع شده و در اواخر مهرماه خاتمه می یابد لذا می توان جهت پیشگیری و کنترل بیماری در ماههای فعالیت این پشه خاکی بخصوص مرداد وشهریور که شاهد آلودگی پشه خاکی بوده ایم نسبت به اجرای برنامه بهداشتی مناسب اقدام نمود.

سپاسگزاری:

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه تحت عنوان «بررسی ناقلین و مخازن لیشمانیوز جلدی روستائی در کانون شهرستان دامغان- استان سمنان» درمقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۸۷و کد ۴۱۹۵ می باشد که در قالب طرح تحقیقاتی مصوب سال ۱۳۸۶ به کد ۶۷۳۰ با حمایت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران اجرا شده است. بدینوسیله از مسئولین امر تشکر و قدردانی می گردد

منابع :

1. Ardahali S, Rezaei H, Nadim A. [Leishmania and Leishmaniasis]. 2nd ed. Tehran: Nashre Daneshgahi Center, 1994. (Persian)
2. Rassi Y, Hanafi bojd AA. [Sand fly, The vector of leishmaniasis]. Tehran: Noavaran Elm, 2006. (Persian)
3. Leishmaniasis. Report of the scientific working group on leishmaniasis, meeting report. 2-4 february 2004, Geneva, Switzerland. Available fromhttp://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. 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.
6. Islamic Republic of Iran Ministry of Heath & Medical Education. [Instruction of leishmaniasis Control]. Tehran: Center for disease control 2007:78 (Persian).
7. Mohamadi Azni S, Rassi Y, Abai MR, Oshaghi MA, Yaghoobi-Ershadi MR, Mohebali M . Fauna and monthly activity of sand flies at zoonotic cutaneous leishmanianisis focus in Damghan district, Semnan province. J Semnan Univ Med Sci 2009; 11: 107-113 (Persian).
8. Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. Med Vet Entomol 1990; 4: 1-24.
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. 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.
11. Singh S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. Indian J Med Res 2006; 123: 311-30.
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. Parvizi P, Mauricio I, Aransay AM, Miles MA, Ready PD. First detection of leishmania major in peridomestic phlebotomus papatasi from Isfahan province, Iran: comparison of nested-PCR of nuclear ITS ribosomal DNA and semi-nested PCR of minicircle kinetoplast DNA. Acta Trop 2005; 93(1): 75-83.
14. Noyes HA, Reyburn H, Bailey JW, Smith DA. nested-PCR-based schizodeme method for identifying leishmania kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its applica-

Archive of SID

www.SID.ir

tion to the study of the epidemiology of leishmania tropica in Pakistan. J Clin Microbiol 1998;36(10): 2877-81.
15. Nadim A, Javadian E. Key for the species identification of sand flies (Diptera : phlebotominae)of Iran . Iranian Journal of Public Health. 1976; 5 (1): 25-28.
16. Ready PD, Lainson R, Shaw JJ, Souza AA. DNA probes for distinguishing psychodopygus wellcomei from psychodopygus complexus (Diptera: Psychodidae). Mem Inst Oswaldo Cruz 1991; 86: 41-49
17. Killick-Kendrick R. The biology and control of phlebotominae sand flies. Med Vet Entomol 1999; 17: 279-289
18. Nadim A, Mesghali A, Amini H. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in the Isfahan province of Iran. III. The vector. Trans R Soc Trop Med Hyg 1968 ; 62(4): 543-549.
19. Abai MR, Rassi Y, Imamian H, Fateh M, Mohebali M, Rafizadeh S, et al. PCR based on identification of vectors of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Shahrood District, Central of Iran. Pak J Bio Sci 2007; 10: 2061-2065.
20. Rassi Y, Mohamad Ghasemi M, Javadian E, Motazedian H, Rafizadeh S, Aghaei Afshar A, et al. [Determine of reservoirs & vectors of cutaneous leishmaniasis by Nested-PCR in villages of Marvdasht district, Fars province]. J Kerman Univ Med Sci 2006; 14: 134-139 (Persian).
21. Nadim A, Seyedi-Rashti MA. A brief review of the epidemiology of various types of leishmaniasis in Iran. Acta Tropica Iranica 1971; 14: 99-106.
22. Yaghoobi Ershadi MR, Javadian E, Tahvildare Bidruni Gh. leishmania major MON-26 isolated from naturally infected Phlebotomus papatasi (Dip:Psychodidae) in Isfahan Province, Iran. Acta Tropica 1995;59:279-82
23. 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 Journal of Arthropod-Borne Diseases 2008; 2(2) : 21-27.
24. Yaghoobi-Ershadi MR, Akhavan AA, Mohebali M. Monthly variation of leishmania major MON26 infection rates in phlebotomus papatasi (Diptera, psychodidae) from rodent burrows in Badrood area of Iran. Med J Islamic Rep Iran 2001;15(3): 175-178.
25. Yaghoobi-Ershadi MR, Javadian E., Tahvildare-Bidruni GH. The isolation of leishmania major from phlebotomus (paraphlebotomus) caucasicus in Isfahan province, Islamic republic of Iran. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 1994 ; 88: 518-519.
26. Nilforushzadeh MA, Sadeghian G. [Cutaneous leishmaniasis]. Tehran: Oruj publication, 2002. (Persian)
27. World Health Organization. Control of tropical diseases, the leishmaniasis. Geneva: WHO/CTD/ICO, 1993: 2.14
28. Yaghoobi Ershadi MR , Akhavan AA , Zahraei Ramezani AR , Javadian E, Motavalli Emami M. Field trial for the control of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Badrood, Iran. Ann Saudi Med 2000; 20(5-6):386-89
29. World Health Organization. Control of the leishmaniasis, technical, report , 1990;18:793
30. Desjeux P. Information of the epidemiology and control of the leishmaniasis by county or teriritory. WHO/Leish/1991;30-47.
31. Yaghoobi-Ershadi MR, Moosa-Kazemi SH, Zahraei-Ramazani AR, Jalai-Zand AR, Akhavan AA, Arandain MH, et al . Evaluation of deltamethrin-impregnated bed nets and curtains for control of zoonotic cutaneous leishmaniasis in a hyperendemic area of Iran. Bull Soc Pathol Exot 2006;99(1):43-8

Archive of SID

www.SID.ir