

## تعیین هویت انگل‌های لیشمانیای جدا شده از بیماران مبتلا به کالآزار با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در استان کرمانشاه

مهدی فخار<sup>1</sup>؛ مسعود کیقبادی<sup>2\*</sup>؛ رضا اکرمی پور<sup>3</sup>؛ کیقباد قدیری<sup>3</sup>؛ مجتبی لیمویی<sup>4</sup>

### چکیده

زمینه: لیشمانیوز احشایی (کالآزار)، بیماری انگلی مهمی است که توسط گونه‌های لیشمانیای دونوانی و اینفانتوم ایجاد می‌شود. شواهد نشان می‌دهد که لیشمانیوز احشایی در بعضی از مناطق استان کرمانشاه وجود دارد. مطالعه حاضر با هدف بررسی خصوصیات عامل ایجادکننده لیشمانیوز احشایی در این استان انجام گرفته است.

روش‌ها: در این مطالعه تجربی از 9 بیمار مبتلا به کالآزار بستری شده در بخش اطفال بیمارستان‌های کرمانشاه در سال‌های 88-1383 نمونه مغز استخوان تهیه گردید. از اسلایدهای میکروسکوپی، DNA استخراج و جهت تعیین گونه انگل با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز اختصاصی گونه مورد بررسی قرار گرفت. برای این کار با استفاده از پرایمر LINR4 و LIN17 قطعه متغیر از حلقه‌های کوچک DNA کینوپلاستی انگل لیشمانیا تکثیر و بر روی ژل آگاروز 1/5 درصد الکتروفورز گردید.

یافته‌ها: تمامی بیماران به جز یک مورد از نظر سرولوژی با استفاده از آزمون ایمونوفلورسانس غیرمستقیم مثبت بودند. در بررسی اسمیرهای مستقیم مغز استخوان، اماستیکوت‌های انگل (اجسام لیشمن) به تعداد نسبتاً فراوان مشاهده شد. تمامی نمونه‌ها در آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، ایجاد باندهای به اندازه 720 جفت باز نمود. مقایسه این باندها با باندهای گونه‌های استاندارد، مشخص نمود که گونه انگل در تمامی بیماران لیشمانیا اینفانتوم می‌باشد.

نتیجه‌گیری: تعیین گونه با استفاده از PCR یک مرحله‌ای و پرایمرهای LINR4 و LIN17 مناسب است و همچنین عامل لیشمانیوز احشایی در کرمانشاه لیشمانیا اینفانتوم می‌باشد. بنابراین انجام مطالعه‌ای جامع در خصوص سرواپیدمیولوژی بیماری در انسان و مخازن حیوانی در استان ضروری است.

کلیدواژه‌ها: لیشمانیوز احشایی، کالآزار، لیشمانیا اینفانتوم، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

«دریافت: 1389/2/9 پذیرش: 1389/6/2»

1. گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
2. گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، مرکز تحقیقات سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه
3. گروه اطفال، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه
4. گروه بهداشت عمومی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

\* عهده‌دار مکاتبات: کرمانشاه، دانشکده بهداشت، مرکز تحقیقات سلامت دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، صندوق پستی: 671551797.

تلفن: 09123858799

Email: keighobadi\_masoud@yahoo.com

### مقدمه

واحشایی قابل مشاهده است. لیشمانیوز احشایی، فرم سیستمیک بیماری است که کالآزار نام دارد و توسط گونه‌های لیشمانیا دونوانی (*Leishmania donovani*) و اینفانتوم (*Leishmania infantum*) ایجاد می‌شود. لیشمانیوز احشایی در بیشتر مناطق ایران به صورت

لیشمانیازیس دربرگیرنده طیف وسیعی از بیماری‌ها از ضایعه جلدی تا لیشمانیوز احشایی کشنده می‌باشد که توسط گونه‌های مختلف انگل لیشمانیا ایجاد می‌شود. تظاهرات بالینی بیماری به سه فرم جلدی، جلدی مخاطی

کاربرد داشته باشد. به طور کلی تعیین هویت انگل‌های مولد لیشمانیوز احشایی از اهمیت خاصی برخوردار است چرا که از یک طرف با افزایش موارد ابتلا به بیماری ایدز در کشورهای جهان سوم و در حال توسعه، الگوی بالینی بیماری پیچیده‌تر شده است و از طرف دیگر گزارش‌های متعددی از پتانسیل ایجاد عفونت احشایی به وسیله سوش‌های انگل لیشمانیا تروپیکا در انسان از نقاط مختلف دنیا از جمله از سربازان آمریکایی در جنگ خلیج فارس و استان فارس باعث ایجاد نگرانی‌هایی در خصوص اپیدمیولوژی این بیماری شده است (4، 8 و 9).

تاکنون مطالعه‌ای که تعیین‌کننده عوامل مولد لیشمانیوز احشایی در استان کرمانشاه باشد صورت نگرفته است. در مطالعه حاضر برای اولین بار انگل‌های لیشمانیای جدا شده از بیماران مبتلا به لیشمانیوز احشایی در استان کرمانشاه به کمک روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تعیین هویت شده است.

### مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، 9 بیمار مبتلا به کالآزار مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های امام رضا و رازی در سال‌های 88-1383، ابتدا به وسیله پزشک متخصص کودکان و فوق تخصص خون از نظر معاینات بالینی مورد بررسی قرار گرفتند و پس از مشکوک شدن به این بیماری، سونوگرافی شکم، آزمایش‌های شمارش کامل سلول‌های خونی (Cell Blood Count (CBC)، ادرار و سرولوژی به منظور رد یا تأیید بیماری درخواست شد. همچنین جهت تأیید نهایی، اسپیراسیون مغز استخوان نیز درخواست گردید. اسمیرهای مستقیم مغز استخوان پس از ثابت نمودن با الکل متیلیک، با رنگ گیمسا رنگ‌آمیزی گردید.

از میان 9 بیمار مورد مطالعه، 5 بیمار مذکر و 4 بیمار دیگر مؤنث و میانگین سنی آن‌ها 2/5 سال بود. این بیماران ساکن روستاهای مختلف استان از جمله شهر

اسپورادیک (تک‌گیر) و در مناطقی از استان‌های اردبیل (مشکین شهر و دشت مغان)، آذربایجان شرقی (اهر و کلیسر)، فارس (فیروزآباد، جهرم، نورآباد و داراب)، بوشهر (بrazجان و خورموج) و قم (بخش خلجستان) به صورت آندمیک دیده می‌شود (1 و 2). مخازن بیماری، سگ و سگ‌سانان (روباه و شغال) و ناقلین آن را گونه‌های مختلف پشه خاکی تشکیل می‌دهند. این بیماری در ایران اغلب در کودکان زیر ده سال (98%) دیده می‌شود. بیشتر بین روستاییان شایع بوده و به طور کلی بیشترین موارد بیماری مربوط به عشایر استان‌های مختلف کشور می‌باشد. این بیماری طیف وسیعی از علایم را به دنبال خواهد داشت و از موارد بدون علامت تا موارد کشنده و حاد گزارش شده است و در بعضی از مناطق کشور، عفونت غیرآشکار بسیار شایع‌تر از بیماری بالینی است. همچنین مواردی از کالآزار همراه با لیشمانیوز پوستی منتشر از جنوب ایران (استان فارس) گزارش شده که عامل آن لیشمانیا تروپیکا بوده است (4-1).

در مطالعه انجام شده به وسیله دکتر قینی و همکاران (73-1369) بر روی پرونده‌های بیمارستانی در بیمارستان‌های شهرستان کرمانشاه مشخص گردید که لیشمانیوز احشایی به طور اسپورادیک در مناطق مختلف استان کرمانشاه (از جمله شهرهای جوانرود، روانسر، دهران و کرمانشاه) وجود دارد. در این مطالعه مشخص گردید که طی یک دوره پنج‌ساله (73-1369) تعداد 5 بیمار با تشخیص قطعی بیماری کالآزار (مشاهده اجسام لیشمن در اسمیر مغز استخوان) در بخش اطفال بیمارستان‌های شهرستان کرمانشاه بستری شده‌اند. بیشترین موارد بیماری در شهر جوانرود و موارد بعدی از مناطق کرمانشاه، روانسر و دهران بوده است (5).

به طور کلی یکی از اصول مهم در کنترل و پیشگیری بیماری لیشمانیوز، شناسایی و تعیین مشخصات گونه‌های مختلف ایجادکننده آن است. از سوی دیگر، تعیین سوش غالب در یک منطقه می‌تواند در مطالعات دارویی، تهیه واکسن و تهیه آنتی‌ژن مناسب به منظور تشخیص بیماری

عکسبرداری گردید و با توجه به شاخص وزنی، گونه انگل مشخص شد.

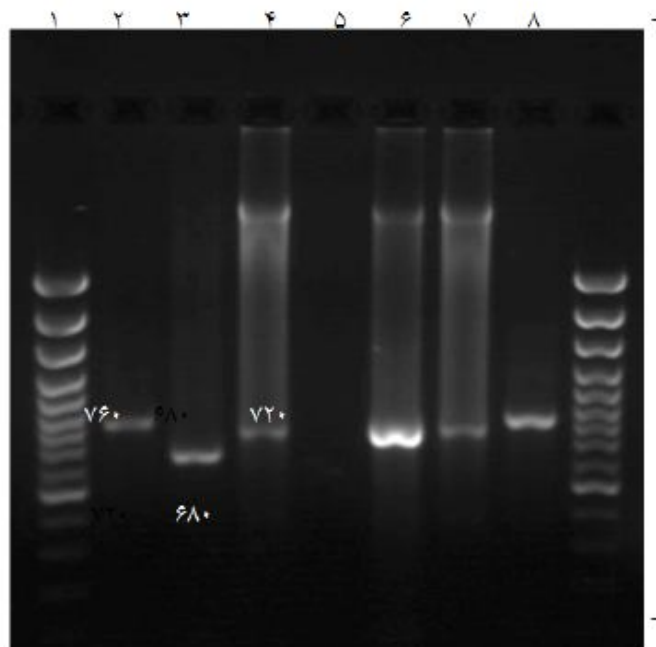
### یافته‌ها

علامت بالینی مشاهده شده در این بیماران بیشتر شامل هپاتواسپلنومگالی و تب طولانی مدت بود. عمده ترین شکایت بیماران، درد شکم، تب بالا و کاهش اشتها بوده است. آزمایش های خون شناسی نشان دهنده کم خونی، ترومبوسیتوپنی، لکوپنی، هیپرگاماگلوبولینمی، هیپوآلبومینمی (برعکس شدن نسبت آلبومین به گلوبولین سرم) و طبیعی بودن آزمون های عملکرد کبد (Liver Function Test (LFT)) بود. در آزمایش های سرولوژی بیماران از آزمون ایمونوفلورسانس غیرمستقیم (Immunofluorescent Antibody Test) استفاده شد. در این آزمون، تیتراستی بادی 1:128 و بالاتر به عنوان تیترا مثبت در نظر گرفته می شود. در مطالعه حاضر تمامی بیماران دارای عیار آنتی بادی ضد لیشمانیایی احشایی برابر 1:128 و بالاتر بودند، به همین دلیل بیماران بجز یک مورد که بیمار مبتلا به سندروم فانکونی نیز بود، از نظر سرولوژی مثبت بودند. با بررسی اسمیرهای مستقیم مغز استخوان، آماستیگوت های انگل (جسام لیشمن) به تعداد نسبتاً فراوان مشاهده شد.

0bp برای تعیین گونه انگل در روش واکنش زنجیره ای پلی مرارز باند حاصل برای لیشمانیا اینفانتوم 720 جفت باز، لیشمانیا تروپیکا 760 جفت باز و برای لیشمانیا ماژور 650 جفت باز می باشد. تمامی نمونه های جدا شده از بیماران کالآزاری مورد مطالعه در آزمایش واکنش زنجیره ای پلی مرارز باند 720 جفت باز ایجاد نمودند. مقایسه باندهای حاصل از نمونه های جدا شده این بیماران با گونه های استاندارد، نشان داد که گونه انگل مولد لیشمانیوز احشایی در تمامی بیماران مورد مطالعه، لیشمانیا اینفانتوم می باشد (تصویر 1).

جوانرود روستای (کلاش لولم)، روانسر، سرپل ذهاب و کرمانشاه بودند.

برای استخراج DNA از اسلایدهای رنگ آمیزی شده مغز استخوان مربوط به بیماران مبتلا به کالآزار استفاده شد. برای تعیین گونه انگل در بیماران مذکور، از روش وینسی (Vince) و همکاران استفاده گردید (6). سپس DNA استخراج شده، جهت آزمایش واکنش زنجیره ای پلی مرارز اختصاصی گونه مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور با استفاده از پرایمر LINR4 و LIN17 قطعه متغیر از حلقه های کوچک (Minicircles) DNA کینوپلاستی انگل لیشمانیا در یک مرحله تکثیر داده شد (7). مواد لازم برای واکنش زنجیره ای پلی مرارز برای نمونه ای به حجم 25 میکرولیتر به این قرار بود: Taq DNA پلی مرارز (سیناژن ایران) یک واحد، بازهای دی اکسی نوکلئوتید 2/5 میلی مول، کلرید منیزیم 2 میلی مول، بافر واکنش زنجیره ای پلی مرارز (سیناژن ایران) 2/5 میکرولیتر، نانوگرم از پرایمرهای LINR4(GGGGTTGGTGTAAAATAGGG-3) و LIN17(5-TTTGAACGGGATTTCTG-3) به این مجموعه 5 میکرولیتر از DNA مورد نظر اضافه شد. سپس نمونه های آماده شده در دستگاه ترموسایکلر (تیچن و کمبریج (Techen & Cambridge) ساخت انگلستان) با برنامه ذیل قرار داده شدند: در مرحله اول، دمای 94 درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه در یک مرحله، در مرحله دوم، 1- دمای 94 درجه به مدت 30 ثانیه، 2- دمای 52 درجه به مدت 30 ثانیه و 3- دمای 72 درجه به مدت 1 دقیقه که مرحله دوم، 30 بار تکرار گردید. در مرحله سوم، دمای 72 درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه در یک مرحله انجام گرفت. پس از انجام واکنش زنجیره ای پلی مرارز، محصول به دست آمده بر روی ژل آگاروز 1/5 درصد الکتروفورز شده و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی گردید. سپس بر روی دستگاه ترانس ایلومیناتور قرار داده شده و از ژل حاوی باندها



تصویر 1- نتیجه الکتروفورز محصولات PCR اختصاصی نمونه‌های مغز استخوان با پرایمرهای LIN<sub>4</sub> و LIN<sub>17</sub> در ژل آگاروز 1/5 درصد

1- مارکر 100 bp	2- استاندارد L.t	3- استاندارد L.m	4- استاندارد L.i
5- کنترل منفی	6- L.i (مغز استخوان)	7- L.i (مغز استخوان)	8- استاندارد L.t

## بحث

در مطالعه حاضر مشخصات عامل مولد بیماری کالآزار در استان کرمانشاه برای اولین بار به کمک روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تعیین گردید. جهت تعیین گونه انگل‌های لیشمانیا، روش‌های مختلف مولکولی و بیوشیمیایی به کار گرفته شده‌اند که در این بین، روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به دلیل آن‌که مستقیماً بر ژنوم انگل تأکید دارد و امروزه طبقه‌بندی موجودات مختلف بر پایه خصوصیات ژنتیک آن‌ها تعریف می‌شود، دارای ارزش ویژه‌ای است. از مزایای انجام روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در تشخیص کالآزار می‌توان به تشخیص زودرس، حساسیت و ویژگی بالا، عدم نیاز به کشت انگل و استفاده از اسلایدهای بایگانی شده بیماران و به طور کلی انجام آن بر روی نمونه‌های بالینی به‌طور مستقیم اشاره نمود (10). تاکنون روش‌های واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به کار گرفته شده، انواع مختلفی از DNA لیشمانیایی را جهت تکثیر مورد هدف قرار داده‌اند.

اما براساس تحقیقات انجام شده به نظر می‌رسد از بهترین این اهداف که می‌تواند بیشترین حساسیت و ویژگی را فراهم نماید تکثیر حلقه‌های کوچک DNA کیتوپلاستی لیشمانیا باشد. از حلقه‌های کوچک در هر سلول انگل لیشمانیا تعداد فراوانی کپی (10 هزار کپی) موجود بوده و طول متوسط هر یک بین 700-1000 جفت نوکلئوتید است. هر حلقه کوچک از دو قطعه ثابت و متغیر تشکیل یافته که سکانس قطعه ثابت در گونه‌های مختلف لیشمانیا یکسان است، لذا از تکثیر آن جهت تشخیص جنس لیشمانیا استفاده می‌شود، اما سکانس و طول قطعه متغیر در انواع گونه‌های انگل لیشمانیا متفاوت بوده لذا با تکثیر این قطعه و بر اساس تفاوت وزن باندهای حاصل می‌توان گونه‌های مختلف را جداسازی نمود. پرایمرهای LINR<sub>4</sub> و LIN<sub>17</sub> به کار رفته در این تحقیق، تأمین کننده چنین هدفی بود (10-13). پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه (LINR<sub>4</sub> و LIN<sub>17</sub>)، از روش Aranssay و همکاران (7) اقتباس شد. البته این پژوهشگران روش Semi-nested PCR

در ایران و کشورهای حوزه مدیترانه همخوانی دارد. لازم به ذکر است که پژوهش مشابه مطالعه حاضر که بر روی اسلایدهای مغز استخوان انجام شده باشد در سایر کشورهای مدیترانه‌ای یافت نشد.

### نتیجه‌گیری

در مجموع، نتایج این مطالعه برای اولین بار مشخص نمود که عامل مولد کالآزار در استان کرمانشاه، لیشمانیا اینفانتوم است. روند رو به رشد کالآزار و استقرار عشایر در بعضی از نواحی استان کرمانشاه، حاکی از نوپیدایی بیماری در این استان است. از عوامل احتمالی مرتبط با نوپیدایی بیماری در استان می‌توان به کوچ عشایر به استان‌های مجاور زاگرس، افزایش آگاهی پزشکان، در دسترس قرار گرفتن تست‌های تشخیصی، تغییرات آب و هوایی و ضعف سیستم ایمنی اشاره نمود. در پایان پیشنهاد می‌گردد مطالعات جامع در خصوص جنبه‌های مختلف لیشمانیوز احشایی (از جمله مخازن و ناقلین) در استان کرمانشاه انجام گیرد. همچنین کارگاه‌های آموزشی برای پزشکان و کارکنان بهداشتی و درمانی توصیه می‌شود.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از دکتر منصوری معاونت وقت بهداشتی استان، مهندس اردلان، جناب آقای قاضی‌زاده و به‌خصوص همکاری بسیار خوب مرکز بهداشت و واحد بیماری‌های جانورود و بهورز کلاش لولم به‌خاطر همکاری در انجام این طرح، کمال تشکر و قدردانی داریم.

را که یک روش PCR دومرحله‌ای است معرفی کرده‌اند. در مطالعه ما، جهت رفع اشکالات در روش‌های PCR دو مرحله‌ای (7) از قبیل وقت‌گیر بودن، دشواری در اجرا به‌ویژه در بررسی‌های اپیدمیولوژیک و تشخیص بیماری با استفاده از نمونه‌های بالینی دارای عوامل مخدوش‌کننده بیشتر روش PCR یک‌مرحله‌ای طراحی شده و مورد بررسی قرار گرفت. این روش علاوه بر قابلیت تعیین گونه انگل، از سهولت نسبی و حساسیت و ویژگی مناسب نیز برخوردار است.

نتایج مطالعه حاضر روشن نمود که عامل مولد بیماری کالآزار در استان کرمانشاه لیشمانیا اینفانتوم می‌باشد. در مطالعه مشابه انجام شده در استان کهگیلویه و بویراحمد بر روی 6 بیمار مبتلا به کالآزار بستری شده در بیمارستان کودکان یاسوج، عامل مولد لیشمانیوز احشایی، لیشمانیا اینفانتوم گزارش شد (14). در مطالعه مظلومی و همکاران در شمال غرب ایران از 21 نمونه جدا شده از بیماران مبتلا به کالآزار، انگل مورد نظر در تمامی موارد، لیشمانیا اینفانتوم گزارش گردید (15). در مطالعه مجبعلی و همکاران (2005) در مناطق آندمیک ایران، لیشمانیا اینفانتوم از سگ و شغال (مخازن کالآزار) جدا گردید (2). در مطالعه فخار و همکاران (2008) بر روی اسلایدهای آسپیراسیون مغز استخوان تهیه شده از مناطق مختلف استان فارس، با روش‌های species-specific PCR, Semi-Nested PCR و Microsatellite گونه اصلی بیماری لیشمانیا اینفانتوم و عامل دوم سوش احشاء دوست لیشمانیا تروپیکا گزارش گردید (16 و 17). عامل اصلی بیماری کالآزار در کشورهای حوزه وسیع مدیترانه، لیشمانیا اینفانتوم گزارش شده است (18). مطالعه ما با سایر مطالعات انجام شده

### References

1. Fakhar M, Motazedian MH, Asgari Q, Mohebbali M, Mehrabani D. [A new endemic focus of visceral Leishmaniosis in Southern Iran (Persian)]. *Armaghane-Danesh* 2006; 11(2): 104-10.
2. Mohebbali M, Hajjaran H, Hamzavi Y, Mobedi I, Arshi S, Zarei Z, et al. Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniosis in the Islamic Republic of Iran. *Vet Parasitol* 2005; 129(3-4): 243-51.
3. Asgari Q, Fakhar M, Motazedian MH. Nomadic Kala-azar in South of Iran. *Iranian J Public Health* 2006; 35(3): 85-86.

4. Alborzi A, Pouladfar GR, Fakhar M, Motazedian MH, Hatam GR, Kadivar MR. Isolation of *Leishmania tropica* from a patient with visceral leishmaniasis and disseminated cutaneous leishmaniasis, Southern Iran. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 79(3): 435-7.
5. Shobeiri R. [Study on patients infected to kala-azar in Kermanshah town (Persian)]. MD thesis. Kermanshah: School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences 1993-1994.
6. Vince A, Poljak M, Seme K. DNA extraction from archival Giemsa-stained bone marrow slides: Comparison of six rapid methods. *Br J Haematol* 1998; 101(2): 349-531.
7. 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): 1933-8.
8. Magill AJ, Gr?gl M, Gasser RA Jr, Sun W, Oster CN. Visceral infection caused by *Leishmania tropica* in veterans of Operation Desert Storm. *N Engl J Med* 1993; 328(19): 1383-7.
9. Geramizadeh B, Fakhar M, Motazedian MH. Visceral leishmaniasis with duodenal involvement: three immunocompetent cases from Southern Iran. *Ann Trop Med Parasitol* 2006; 100(7): 637-40.
10. Noyes HA, Reyburn H, Bailey JW, Smith D. A Nested PCR-based schizodeme method for identifying *Leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. *J Clin Microbiol* 1998; 36(10): 2877-88.
11. Lauchaud L, Chabbert E, Dubessay P, Oreynes J, Lamothe J, Bastien P. Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood. *J Clin Microbiol* 2001; 39(2): 613-7.
12. Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol* 1990; 71(3): 267-75.
13. Motazedian MH, Karamian M, Noyes HA, Ardehali S. DNA extraction and amplification of *Leishmania* from archived, Giemsa-stained slides, for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis by PCR. *Ann Trop Med Parasitol* 2002; 96(1): 31-4.
14. Sarkari B, Fakhar M, Hatam GhR, Motazedian MH, Ebrahimi S, Kalantari M, et al. [Characterization of *Leishmania* parasites isolated from Kala-azar patients in Kohgiluyeh and BoyerAhmad, using semi-nested PCR (Persian)] *Armaghane-Danesh* 2006; 11(1): 27-32.
15. Mazloumi Gavgani AS, Esmali H, Davies CR. [Species and strain identification of the *Leishmania* isolated from Kala-azar patients in North West of Iran (Persian)]. *J Uromia Univers Med Scienc* 2004; 15 (1): 39-46.
16. Fakhar M, Motazedian MH, Daly D, Lowe C, 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): 567-74.
17. Fakhar M, Motazedian MH, Hatam GR, Asgari Q, Kalantari M, Mohebbali M. Asymptomatic human carriers of *Leishmania infantum*: possible reservoirs for Mediterranean visceral leishmaniasis in southern Iran. *Ann Trop Med & Parasitol* 2008; 102(7): 577-83.
18. World Health Organization. The leishmaniasis. Technical report 1990; 793: 27.