Archive of SID

تهیه مایه لیشمن استاندارد و ارزشیابی آن جهت لیشمانیزاسیون در مدل حیوان آزمایشگاهی

دکتر مهدی محبعلی[۱]، دکتر علی مهرابی‌توانا[۲]، دکتر عزت‌الدین جوادیان[۱]، علی‌اکبر اصفهانی[۲]، هما حجاران[۱]، بهناز آخوندی[۱]

Title: *Preparation and standardization of Leishmania suspension and its evaluation for leishmaniazation in a laboratory animal model .*

Authors: *Mohebali M,(DVM, MPH, Ph.D); Mehrabi Tavana A,(PhD); Javadian E,(DVM, PhD); Esfahani A (MSc); Hajjaran H,(MSc); Akhoundi B,(MSc).*

Introduction: *This study was designed for preparation and evaluation of standard Leishmania suspersion against small-white mice(out-bred).*

Methods: *Leishmania suspension was prepared from Leishmania major (MRHO/IR/75/ER). The Leishmania parasites were cultured in Schneider and RPMI1640 culture media. We then, subcultured them for each 72 hours interval. The promastigotes were harvested 120 hours post the fourth subculture and washed with isotonic normal saline. The parasite suspension was mixed with phosphate buffer saline (PBS, pH=7.2) or isotonic glucose- Nacl and glycerole 10% and counted by Neobar procedure ($2X10^7$ parasite /ml) and then were gradually freezed in liquid nitrogen. Viability test showed that from 5 to 25% of promastigotes were alive after this process. Two hundred and thirty seven mice (outbred-souri) were divided to two groups. Group 1 (135) were inoculated by 0.1 ml of Leishmania suspension subcutaneously in their base of tail. The mice of control group(102) were injected by isotonic normal saline with the same procedure.*

Results: *Lesions were manifested from one to 6 months post inoculation. Fifty eight (63%) of the rest mice from interventional group ,were infected versus none of the mice from control group showed any lesion. Leishmanin skin test (LST) conversion rate was significant higher in interventional group compare, to control group after 72 hours. (54.1% VS 4.3%, P>0.05).*

Conclusion: *In conclusion, this study showed the standard Leismania suspension can produce lesion and provoke the CMI in the small-white mice.*

Keywords: *Standard Leishmania suspension , evaluation , animal model.*

۱- دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله اعظم (عج)

www.SID.ir

Archive of SID

چکیده:

مقدمه: *این مطالعه به منظور تهیه مایه لیشمن استاندارد و ارزشیابی آن جهت لیشمانیزاسیون در موش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی انجام گردید.*

روش‌کار: *با استفاده از لیشمانیا ماژور سوش اصفهان(MRHO/IR/75/ER) مایه لیشمن استاندارد تهیه گردید. برای تهیه مایه لیشمن استاندارد پس از کشت این انگل در محیط‌های* Schneider *و* RPMI1640 *و پاساژ آنها به فواصل ۷۲ ساعت ، پاساژ چهارم که ۱۲۰ ساعت از آن گذشته بود برداشت شده و پس از هاروست نمودن پروماستیگوت‌ها سه مرتبه با سرم فیزیولوژی ۹ در هزار شستشو گردیدند. سوسپانسیون انگلی تهیه شده در* PBS *یا سرم قندی- نمکی با گلیسرول به نسبت ۱۰ درصد مخلوط شده و پس از شمارش در ویال‌های استریل به میزان یک میلی لیتر تقسیم گردیدند و به طور تدریجی در نیتروژن مایع منجمد شدند. میزان زنده بودن پروماستیگوت‌ها پس از انجماد ۵ تا ۲۵ درصد تعیین گردید. تعداد ۲۳۷ موش سفید کوچک آزمایشگاهی (سوری) به دو گروه واکسینه (۱۳۵ عدد) و کنترل (۱۰۲ عدد) تقسیم شده و پس از بازیافت مایه لیشمن منجمد شده به هریک از موش های تحت مداخله ۰/۱ میلی‌لیتر از آن به شکل زیر جلدی و در قاعده دم تلقیح گردید. به موش‌های گروه کنترل ۰/۱ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی ۸/۵ در هزار تزریق شد.*

یافته‌ها: *نتایج حاصله نشان دادند از یک ماه پس از تلقیح مایه لیشمن در گروه تحت مداخله، ضایعات لیشمانیوز جلدی ظاهر شدند به طوریکه ٦ ماه پس از تلقیح تعداد ۵۸ عدد از موش‌های باقیمانده (٦۳ درصد) به لیشمانیوز جلدی مبتلا شده بودند. با استفاده از روش‌های پارازیتولوژی جسم لیشمن در تمامی ضایعات دیده شد. با استفاده از لیشمانین تهیه شده در انستیتوپاستور ایران تمامی موش‌های گروه‌های تحت مداخله و کنترل آزمایش پوستی شدند. نتایج حاکی از آن بود که ۵۹ عدد از موش‌های تحت مداخله (٦٤/١ درصد) پس از گذشت ۷۲ ساعت دارای نتیجه پوستی مثبت بودند در حالیکه تنها ۲ عدد (٤/٣ درصد) موش‌های گروه شاهد نتیجه مثبت جلدی به همراه داشتند.*

نتیجه‌گیری: *یافته‌های فوق نشان می‌دهند که مایه لیشمن استاندارد قادر به ایجاد زخم و نهایتاً باعث تحریک سیستم ایمنی سلولی موش‌های تحت مداخله می‌شود و لذا می‌توان آن را جهت لیشمانیزاسیون افراد در معرض خطر خصوصاً در مناطق هیپراندمیک لیشمانیوز جلدی روستائی مورد ارزیابی قرار داد .*

گل‌واژگان: *مایه لیشمن استاندارد، ارزشیابی، مدل حیوانی.*

مقدمه:

لیشمانیوز جلدی (سالک) یکی از بیماری‌های بومی اکثر نقاط کشور به شمار می‌رود (۱). تلاش‌های مداوم جهت کنترل و پیشگیری این بیماری تاکنون موفقیت‌آمیز نبوده است (۲). جهت کنترل لیشمانیوز جلدی از روش‌های مبارزه با ناقلین، از بین بردن مخازن و ایمن سازی افراد سالم می‌توان استفاده نمود (۳). لیشمانیزاسیون به‌عنوان یک روش کارآمد جهت کنترل لیشمانیوز جلدی خصوصا در مناطق اندمیک این بیماری در ایران و بعضی ازکشورهای جهان مورد استفاده قرار گرفته است (۶-۴). براساس مطالعات انجام شده، لیشمانیزاسیون میزان عفونت لیشمانیوز پوستی را با نسبت‌های ۱ به ۶ تا ۱ به ۸ تقلیل داده و از ابتلاء طبیعی ۸۶/۹٪ افراد لیشمانیزه جلوگیری کرده است (۷).

در برنامه لیشمانیزاسیون از پروماسیتگوت‌های زنده و فعال لیشمانیا ماژور که در محیطNNN کشت داده شده بودند، استفاده می‌گردید. این‌گونه از انگل لیشمانیا با لیشمانیا تروپیکا ولیشمانیا پاناماننسیس ایمنی متقاطع دارد (۸).

به علت حمل و نقل، تغییر شرایط محیطی و گاهی تأخیر در زمان تلقیح، تعداد پروماستیگوت‌ها، نحوه فعالیت و زنده ماندن آنها دچار تغییرات قابل ملاحظه‌ای می‌شدند و لذا علاوه بر آنکه میزان تلقیح انگل‌ها استاندارد نبود در عده‌ای از افراد لیشمانیزه ایمنی کامل در مقابل لیشمانیوز جلدی بوجود نمی‌آمد و این افراد در اثر گزش پشه خاکی‌های آلوده به لیشمانیوز جلدی مبتلا می‌گردیدند (۹). علاوه بر آن در حال حاضر از لیشمانیزاسیون جهت ارزیابی واکسن‌های لیشمانیوز جلدی استفاده میگردد (۱۰و

www.SID.ir

Archive of SID

۱۱). لذا هدف اصلی این مطالعه تهیه مایه لیشمن استاندارد و ارزشیابی آن درموش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی بوده‌است تا پس از حصول نتیجه مطلوب در انسان نیز مورد ارزیابی قرارگیرد.

روش‌کار:

الف- تهیه مایه لیشمن استاندارد :

ابتدا انگل لیشمانیا ماژور سوش اصفهان (MRHO/IR/75/ER) که در سال ۱۹۶۴ از یک عدد رومبومیس استان اصفهان جدا شده بود و قبلاً نیز مایه لیشمن در ایران از این سوش تهیه می‌گردید در محیط RPMI1640 حاوی ۲۰ درصد سرم جنین گوساله کشت گردید. پس از انجام آزمایش لازم از نظر حضور و زنده بودن پروماستیگوت‌ها، هر ۷۲ ساعت یکبار بر حجم این محیط‌ها افزوده گردید. به‌طوریکه پس از گذشت ۱۲۰ ساعت پس از پاساژ چهارم میزان ۳۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی پروماستیگوت‌های زنده و فعال تهیه گردید. جهت کشت از دمای ۲۶ ^{o}C و هم‌زن با دور ۶۰rpm استفاده گردید.

به منظور تهیه مایه لیشمن استاندارد مراحل زیر به ترتیب انجام گردیدند:

۱- یکبار شستشو با سانتریفوژ یخچالدار با دور ۳۰۰۰rpm در دمای ۴^{o}C.

۲- سه مرتبه شستشو با سرم فیزیولوژی ۹ در هزار با rpm ۲۵۰۰ مطابق روش فوق.

۳- تهیه سوسپانسیون انگلی در سرم قندی– نمکی با pH=7.2 و گلیسرول ۱۰ درصد.

۴- تأیید مرحله فاز ایستای رشد با استفاده از روش peanut agglutination test (۱۲).

۵- تنظیم پروماستیگوت‌ها به میزان ۲۰ میلیون در هر میلی‌لیتر و شمارش آنها با لام توما و یا نئوبار.

۶- تقسیم آنها در ویال‌های استریل به طوریکه هر ویال حاوی یک میلی‌لیتر مایه لیشمن باشد.

۷- کنترل مایه لیشمن تهیه شده ازنظر وجود باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی با استفاده از محیط‌های آگار خوندار و تیوگلیکولات.

۸- کنترل زنده بودن پروماستیگوت‌ها قبل و پس از گلیسرینه کردن.

۹- تلقیح ۰/۱ میلی‌لیتر از مایه لیشمن تهیه شده به قاعده دم ده عدد موش Balb/C به روش زیر جلدی جهت مطالعه عفونت‌زائی آن در حیوان حساس.

انجماد نمونه‌ها به شکل تدریجی انجام می‌گردید به‌طوریکه هر یک از نمونه‌ها نیم ساعت در حرارت آزمایشگاه و یک هفته در برودت ۸۵^{o}C نگهداری شده و سپس به تانک‌های حاوی نیتروژن مایع با برودت ۱۹۶^{o}C- منتقل می‌گردیدند.

ب: نحوه بررسی مایه لیشمن استاندارد در حیوانات حساس آزمایشگاهی:

تعداد ۲۵۰ عدد موش سوری ۸-۶ هفته‌ای ماده در قفس‌های جداگانه در حیوانخانه دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله نگهداری گردیدند. پس از دو هفته ۲۳۷ عدد از موش‌های باقیمانده به دو گروه به شرح زیر تقسیم شدند:

۱- گروه تحت مداخله: تعداد ۱۳۵ عدد از موش‌های سوری به‌وسیله ۰/۱ میلی‌لیتر مایه لیشمن استاندارد مورد تلقیح قرار گرفتند. تزریقات زیر پوستی و در قاعده دم حیوانات مذکور انجام گردید. قبل از تلقیح، هر یک از لوله‌های محتوی مایه لیمشن منجمد شده به مدت دو دقیقه و ۱۵ ثانیه در داخل بن‌ماری ۳۷^{o}C قرار داده شدند و از ۱۰تا۲۰ دقیقه پس از بازیافت مورد استفاده قرار گرفتند. در این مرحله هر سری مایه لیشمن با میکروسکوپ زمینه سیاه و با درشتنمائی ×۴۰۰ مورد بررسی قرار گرفتند و بدینوسیله نمونه‌های فاقد پروماستیگوت‌های زنده از مطالعه خارج شدند.

۲- گروه کنترل: تعداد ۱۰۲ عدد از موش‌های سوری به عنوان گروه کنترل به وسیله ۰/۱ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی ۸/۵ درصد به روش فوق مورد تزریق قرار گرفتند. تمامی حیوانات تحت مطالعه هفته‌ای یکبار به مدت ۶ ماه از نظر ظهور ضایعات لیشمانیوز جلدی در محل تلقیح، مورد معاینه قرار گرفتند.

ج: نحوه بررسی ایمنی زائی مایه لیشمن استاندارد در موش‌های سفید آزمایشگاهی : تمامی موش‌های تحت بررسی پس از گذشت حدود ۶ ماه از تزریقات، بوسیله ۰/۰۴ میلی‌لیتر از لیشمانین ساخت انستیتو پاستور ایران (شماره ۱۱۲/۲) تست پوستی شدند. ترزیقات بوسیله سرنگ‌های انسولین در کف پای راست حیوانات تحت بررسی و به صورت زیر جلدی انجام گردید. به منظور مقایسه در کف پای چپ همان موش‌ها ۰/۰۴ میلی‌لیتر PBS به عنوان شاهد تزریق گردید. ضخامت حاصله پس از گذشت ۷۲ ساعت بوسیله کولیس اندازه‌گیری و ثبت گردید.

یافته‌ها:

نتایج حاصل از تست پوستی وایجاد ضایعات جلدی پس از گذشت ۶ ماه از تلقیح مایه لیشمن استاندارد در موش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی در جدول شماره ۱ خلاصه شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- نتایج تست پوستی و ایجاد زخم (Take) شش ماه پس از تزریق در موش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی (سوری).

ایجاد زخم و نتایج پوستی	ایجاد زخم ٦ ماه پس از تزریق		نتیجه تست پوستی ٦ ماه پس از تزریق	
گروهها(تعداد)	مثبت تعداد(درصد)	منفی تعداد(درصد)	مثبت تعداد(درصد)	منفی تعداد(درصد)
تحت مداخله(۹۲)	(۶۳)۵۸	(۳۷)۳۴	(۶۴/۱)۵۹	(۳۵/۹)۳۳
شاهد(۴۷)	(۰)۰	(۱۰۰)۴۷	(۴/۳)۲	(۹۵/۷)۴۵
جمع(۱۳۹)	(۴۱/۷)۵۸	(۵۸/۳)۸۱	(۴۳/۹)۶۱	(۵۶/۱)۷۸

میانگین ضخامت ایجاد شده در تست پوستی ۰/۷۷ میلی‌متر با واریانس ۰/۹۸ بوده است. کمترین میزان ضخامت یک میلی‌متر و بیشترین آن ۳/۵ میلی‌متر بوده است.

همچنین میانگین قطر زخم‌های ایجاد شده ۶ ماه پس از لیشمانیزاسیون ۲/۸۵ میلی‌متر با انحراف معیار ۳/۸۸ بوده است. بزرگترین اندازه زخم ایجاد شده پس از لیشمانیزاسیون ۱۱/۸ میلی‌متر بوده است.

بحث و نتیجه گیری:

مهم‌ترین دستاورد این مطالعه تهیه مایه لیشمن استاندارد است که علیرغم شستشوهای متعدد، گلیسرینه نمودن، فریز کردن و بازیافت پروماستیگوت‌ها بین ۵ تا ۲۵ درصد آنها زنده باقی ماندند و لذا می‌توان گفت در هر میلی‌لیتر مایه لیشمن تهیه شده بین یک تا ۵ میلیون پروماستیگوت زنده و فعال وجود داشته است. بنابراین به هریک از موش‌های گروه‌های تحت مداخله و شاهد میزان ۰/۱ میلی‌لیتر مایه لیشمن استاندارد که حاوی ۱۰۰/۰۰۰ تا ۵۰۰/۰۰۰ پروماستیگوت زنده و فعال لیشمانیا ماژور تلقیح گردیده است. با توجه به تجربیات انجام شده قبلی در دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی و مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی این مقدار پروماستیگوت زنده و فعال جهت لیشمانیزاسیون لازم و ضروری است. در تجربیات قبلی حدود ۹۹ درصد پروماستیگوت‌ها پس از بازیافت مرده و فقط ۱ درصد آنها زنده باقی مانده بودند (مذاکرات شخصی با دکتر خامسی‌پور و دکتر فشارکی)، در حالیکه در این مطالعه پروماستیگوت‌های زنده به ۵ تا ۲۵ درصد افزایش یافته بودند که این موضوع بسیار مهم تلقی می‌گردد.

تعداد پروماستیگوت‌های توصیه شده جهت لیشمانیزاسیون توسط کارشناسان سازمان بهداشت جهانی به میزان ۱/۰۰۰/۰۰۰ در ۰/۱ میلی‌لیتر مایه تلقیح شده تعیین شده بود (۱۳) و تجربیات انجام شده در ایران نشان داد تلقیح ۳۰۰/۰۰۰ پروماستیگوت لیشمانیاماژور نیز قادر به ایجاد زخم پس از ۲ تا ۴ ماه بوده است (۴و۷). لذا مایه لیشمن استاندارد تهیه شده نیز از نظر میزان پروماستیگوت‌های زنده تقریباً در این محدوده قرار دارد.

همانطور که در جدول شماره ۱ مشاهده می‌گردد ۶۳ درصد موش‌ها پس از گذشت ۵ تا ۶ ماه از لیشمانیزاسیون دچار زخم شدند که اصطلاحاً به آن Take گفته می‌شود. میزان ایجاد زخم یا نُدول در محل تلقیح انسان درمطالعات مختلف متفاوت بوده است. در مطالعه‌ای که روی ۲۵۴ کودک زیر یکسال لیشمانیزه انجام گرفت میزان Take ۴۶ درصد گزارش شده است (۴). این میزان در بین نظامیان لیشمانیزه شده حدود ۵۷ درصد بوده است (۷). علت نتایج متغیر در این بررسی‌ها احتمالاً مربوط به مرحله کشت انگل بوده است به طوریکه برای تلقیح باید از انگل‌هائی استفاده شود که در مرحله ایستای رشد باشند. دراین بررسی این مرحله توسط آزمایش Peanut بدست آمد (۱۲) و لذا به این علت میزان Take علیرغم دستکاری‌های زیاد بر روی پروماستیگوت‌ها ۶۳ درصد پس از گذشت ۶ ماه از لیشمانیزاسیون تعیین گردید. جهت بررسی ایمنی‌زائی مایه لیشمن تمام موش‌های تحت بررسی و شاهد که قبلاً تست پوستی لیشمانین آنها منفی بود پس از گذشت ۶ ماه از لیشمانیزاسیون، مجدداً تست پوستی شدند که ۵۹ عدد آنها (۶۴/۱ درصد) دارای نتیجه مثبت شدند. نکته مهم آن که معمولاً پس از بهبودی کامل زخم‌ها، تست پوستی از منفی به مثبت تغییر می‌یابد و به مدت طولانی نیز مثبت باقی می‌ماند به طوریکه دو سال پس از تلقیح مایه لیشمن در عده‌ای از افراد واقع در استان اصفهان تست پوستی در ۹۶ درصد آنان مثبت شده بود (۱۴). البته باید توجه داشت که رقم بالای نتیجه مثبت، پس از بهبودی افراد بوجود آمده بود. در این مطالعه ۶۴/۱ درصد موش‌های لیشمانیزه تست پوستی مثبت را نشان دادند که این می‌تواند به علت حضور زخم‌های فعال بر روی بدن آنها وتفاوت‌های سیستم ایمنی بین انسان و موش باشد. در پایان ازاین مطالعه چنین نتیجه‌گیری می‌شود که تهیه مایه لیشمن استاندارد در شرایط فعلی میسر است. این مایه قادر به Take کردن تعداد قابل توجهی از موش‌های تحت بررسی شده و تست

www.SID.ir

Archive of SID

پوستی را در موش‌های بهبود یافته یا در حال بهبودی از منفی به مثبت تغییر می‌دهد. باتوجه به نتایج مذکور برروی حیوانات آزمایشگاهی توصیه می‌شود جهت مطالعه دقیق‌تر، لیشمانیزاسیون با مایه لیشمن استاندارد درعده‌ای از داوطلبین مورد ارزیابی قرار گیرد تا پس از حصول اطمینان کامل از بی‌خطری آن در مناطقی که سایر راههای کنترلی مؤثر نیستند خصوصاً در مناطق هیپراندمیک لیشمانیور پوستی از این حربه بتوان با اطمینان کامل استفاده نمود.

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله اعظم که پشتیبانی مالی این طرح تحقیقاتی را بعهده داشته است کمال تشکر و قدردانی را دارند. همچنین از ریاست محترم و معاونت پژوهشی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی که شرایط تهیه مایه لیشمن را در آن دانشکده فراهم نمودند تشکر و قدردانی می‌گردد. از آقایان عباس افشار و اصغرخانی و خانم سرور چاره‌دار که در اجرای این مطالعه همکاری نموده‌اند تشکر می‌گردد.

منابع:

۱- ندیم، الف. لیشمانیوزها از کتاب اپیدمیولوژی و کنترل بیماری‌های شایع در ایران تالیف دکتر فریدون عزیزی، دکتر حسین حاتمی و دکتر محسن جانقربانی. انتشارات مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم، چاپ اول، سال ۱۳۷۹، ۵۳۲ –۵۲۴.

۲- محبعلی، م. بیماریهای تک‌یاخته‌ای مشترک بین انسان و حیوانات، انتشارات نادی، چاپ اول، ۱۳۷۵،ص ۸۶–۳۱.

۳- اردهالی، صدرالدین. رضائی، حمیدرضا، ندیم، ابوالحسن. انگل لیشمانیا و لیشمانیوزها، چاپ دوم، مرکز نشر دانشگاهی، ۱۳۷۳، ص ۱۹۲–۱۷۶.

4- Nadim A. Javadian E. Tahvildar-Bidruni G. Effectiveness of leishmanization in control of cutaneous leishmaniasis. Bull soc path Exot, 1983, 76: 303-97.

5- Koufman Z, Egoz N. Observation of immunization against cutaneous leishmanization in Israel. Israel J Med Sc ; 1978, 14(2): 218-21.

6- Sergiev VP, Beislikhem R. Results of mass vaccination against zoonotic cutaneous leishmaniasis. Med Parasitol. 1970, 39: 541–51.

7- Nadim A, Javadian E, Mohebali M. The experience of leishmanization in Islamic Republic of Iran. Eastern Mediter Health J. 1997, 3(2): 284-9.

8- Osovio Y, Gonzalez SJ, Gama VL, et al. Reinfection in american *Cutaneous leishmaniasis*, Evaluation of clinical outcomes in the hamster model.Mem Inst Oswaldo Cruz, 1998, 93(3): 353-6.

۹- محقق حضرتی، صالح. ارزشیابی لیشمانیزاسیون در منطقه جنوب ایران. پایان نامه جهت دریافت درجه فوق لیسانس بهداشت عمومی (MPH) از دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران. سال۱۳۶۶.

10- Khamesipour A. Leishmanization as a tool for control of leishmanization and for evaluation of candidate vaccines against leishmaniasis. Greece, 20-24 May ; 2001.

11- Khamesipour A. Evaluation of Leishmania vaccine by live challenge(leishmanization), VI Iranian congress of Immunology and allergy, Tehran : Iran.7-9 May ; 2002.

12- Keith Howard M, Sayers G, Milles MA. Leishmania donovani metacyclic promastigotes: transformation In vitro, lectin agglutination complement resistance and infectivity. Exp Parasitol, 1987, 64: 147–56.

13- World Health Organization. Control of the leishmaniasis. Technical Report Series,793, Geneva : WHO ; 1990.

۱۴- اساسی، نازیلا. بررسی اثر بخشی لیشمانیزاسیون در پیشگیری از لیشمانیوز پوستی روستائی در منطقه اصفهان. پایان نامه جهت دریافت درجه تخصصی در رشته اپیدمیولوژی از دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران سال تحصیلی ۷۸–۱۳۷۷.

www.SID.ir