مجله دانشكده پزشكي دانشگاه علوم پزشكي مشهد
شماره هشتاد و هفت، سال چهل و هشتم
تابستان ۱۳۸٤، صفحه ۱۸٤ - ۱۷۷

Medical Journal of Mashhad
University of Medical Sciences
Vol.48, No.88, P: 177 - 184
Summer 2005

مقاله اصلي

جداسازي ليشمانيا ميجر به روش ايزوآنزيم الكتروفورزيس در شهر مشهد

دكتر مسعود مهاجري[۱]، دكتر غلامرضا حاتم[۲]، دكتر سيدعلي‌اكبر شمسيان[۳]، خانم آناهيتا جواهري[٤]

تاريخ دريافت: ۸۴/۲/۲۴ - تاريخ پذيرش: ۸٤/۳/۱۳

خلاصه

مقدمه: بر اساس گزارش WHO درحال حاضر ايران به عنوان يكي از كانونهاي مهم ليشمانيوز در جهان شناخته مي‌شود. اين بيماري توسط گونه‌هاي مختلف تك ياخته‌اي از جنس ليشمانيا ايجاد مي‌شود و شناسايي اين گونه‌ها در اتخاذ برنامه‌هاي پيشگيري و كنترل بيماري مؤثر مي‌باشد. به علت تعدد و تشابه شكلي گونه‌هاي انگل رده‌بندي آن به گونه‌ها و سويه‌هاي متفاوت بسيار مشكل است و شواهد اپيدميولوژيكي و باليني نيز به تنهايي در افتراق ميان گونه‌ها كارساز نمي‌باشد. روشهاي مولكولي تحول عظيمي در تعيين هويت انگل ايجاد نموده‌اند. از اين ميان بررسي ايزوآنزيمها نسبت به ساير روشها مناسبتر تشخيص داده شده‌اند.

روش كار: اين مطالعه توصيفی در سال ۱۳۷۹ – ۱۳۷۸ در شهر مشهد با هدف بررسی گونه های مختلف اين بيماری انجام شده است. به رغم اين كه شهر مشهد برمبناي شواهد كلينيكي و اپيدميولوژيكي به عنوان يكي از كانونهاي سالك خشك در كشور شناخته مي‌شود، در سالهاي اخير بيماران متعددي از گوشه وكنار شهر مراجعه مي‌كنند كه داراي زخمهاي با نماي كلينيكي سالك مرطوب مي‌باشند. به منظور دستيابي به اطلاعات دقيق در مورد گونه‌هاي ليشمانياي بومي شهر مشهد، ۷۷ بيمار مورد مطالعه قرار گرفتند و ۱۸ نمونة جداشده از زخمهاي پوستي بيماران مبتلا به ليشمانيوز پوستي در منطقة آب‌وبرق در مقايسه با سويه‌هاي مرجع ليشمانيا ترويپكا و ليشمانيا ميجر، توسط ٦ سيستم آنزيمي NH_2, NH_1, PGM, G6PD, MDH, GPI و با استفاده از روش ايزوآنزيم الكتروفورز در ژل پلي‌آكريل آميد، مورد بررسي قرار گرفتند. مشخصات فردی و نتايج آزمايشگاهی، سابقه بيماری در پرسشنامه ای ثبت گرديد. اطلاعات جمع آوری شده با استفاده از آمار توصيفی و جداول توزيع فراوانی پردازش شد.

نتايج: تمامي نمونه‌هاي مورد مطالعه در اين بررسي به‌طور واضح طرح آنزيمي مشابه سويه مرجع ل. ميجر را نشان دادند.

نتيجه گيری: بر خلاف تصور گذشته، در شهر مشهد علاوه بر ليشمانيا ترويپكا، ليشمانيا ميجر، عامل ليشمانيوز جلدي نوع مرطوب، مي‌تواند در ايجاد ليشمانيوز جلدي خصوصاً در حاشية شهر، نقش داشته‌باشد.

واژه‌هاي كليدي : ليشمانيوز جلدي، ايزوآنزيم الكتروفورزيس، ليشمانيا ترويپكا، ليشمانيا ميجر

۱- دانشيار دانشگاه علوم پزشكي مشهد - بيمارستان قائم(عج) ـ گروه انگل‌شناسي و قارچ‌شناسي ـ داخلي ۲٤۰٦
۲- استاديار دانشگاه علوم پزشكي شيراز
۳- استاديار دانشگاه علوم پزشكي مشهد - نويسنده رابط
٤- كارشناس ارشد انگل‌شناسي

مقدمه

ليشمانيوز ازجمله بيماريهاي مشترك بين انسان و حيوان است كه عامل آن تك ياختهاي متعلق به جنس ليشمانيا مي‌باشد. بر اساس شواهد موجود، وقوع ساليانة بيماري، ۲ ميليون مورد جديد مي‌باشد اما فقط ٦۰۰۰۰۰ مورد آن به‌طور رسمي گزارش مي‌شود. ۳۵۰ ميليون نفر در ۸۸ كشور جهان، در معرض خطر آلودگي و ابتلا به اين بيماري قرار دارند كه ۱۲ ميليون نفرازاين حيث به انواع مختلف ليشمانيوز مبتلا هستند (۱،۲،۳).

افزايش جمعيت، گسترش سريع شهرها، جابجايي جمعيت بين مناطق آلوده و پاك يا بر عكس و همچنين قطع سمپاشيهاي ضد مالاريا، سبب شده است كه ليشمانيوزها، خصوصاً نوع جلدي، به صورت يك مشكل مهم بهداشتي در كشور مطرح گردد. از طرفي در دسترس نبودن واكسن مؤثر جهت پيشگيري از بيماري، زيانهاي اقتصادي ناشي از حذف‌شدن افراد مبتلا از صحنة كار و تلاش جامعه و صرف هزينه‌هاي آزمايشگاه، پزشك و دارو دلايل قطعي جهت لزوم مطالعة بيشتر و دقيق‌تر پيرامون اين بيماري مي‌باشد كه در مرحلة اول تعيين مشخصات دقيق عامل بيماري را ايجاب مي‌نمايند.

امروزه شاخصهاي متفاوتي در رده‌بندي ليشمانياها مورد استفاده قرار مي‌گيرند كه از دقيق‌ترين آنها استفاده از روشهاي مولكولي و ازجمله مقايسة ايزوآنزيمها در ميان گونه‌هاي مختلف مي‌باشد (٤،٥،٦،۷).

از آنجا كه شهر مشهد از كانونهاي مهم بيماري محسوب مي‌شود و تاكنون مطالعات لازم و كلاسيك دربارة تعيين گونه‌هاي عامل ليشمانيوز در نقاط مختلف آن صورت نگرفته و شناخت بيماري تنها بر مبناي شواهد باليني و اپيدميولوژيكي بوده است.

در مطالعات قبلي اين شهر به عنوان يك كانون سالك خشك معرفي شده است و از طرفي خصوصيات ظاهري ضايعات برخي بيماران مراجعه‌كننده از لحاظ تعداد و شكل ظاهري زخمها و فصل شيوع بيماري با خصوصيات ضايعات ناشي از ل. ميجر مطابقت دارد از اين رو اين مطالعه با هدف بررسي شناخت گونة انگلهاي ليشمانياي موجود در شهر مشهد با استفاده از روشهاي آزمايشگاهي مولكولي انجام شده است.

روش كار

اين مطالعه توصيفي در فاصله زماني بهمن ۱۳۷۸ لغايت خرداد ماه ۱۳۷۹ در شهر مشهد انجام نشده است.

تعداد ۷۷ بيمار مشكوك به ضايعات جلدي مشكوك به ليشمانيوز با مراجعه به منطقه آب و برق مشهد مورد بررسي قرار گرفتند كه ۱۸ نمونه جدا شده آن با استفاده از ٦ سيستيم آنزيمي مورد مقايسه قرار گرفتند.

جداسازي انگل از بيماران و كشت انگل: از كلية افرادي كه زخم مشكوك به سالك بودند، پس از تكميل پرسشنامه، نمونة لام مستقيم و كشت تهيه شد.

ترشحات حاصل از زخم بر روي محيط NNN كشت و در درجه حرارت ۲٦°C نگهداري گرديد. براي كشت انبوه انگل محيطهاي مايعRPMI 1640, BHI به همراه۱۰% سرم جنين گوساله غير فعال شده مورد استفاده قرار گرفت. با مشاهدة افزايش تعداد انگل، محيط مايع غني طوري اضافه مي‌گرديد كه تعداد انگل همواره۱ ميليون در ميلي‌ليتر باقي بماند.

نمونه‌ها در انتهاي فاز لگاريتمي جمع‌آوري‌گرديد.استخراج آنزيمهاي محلول: پس از انجام مراحل پيشين بايستي بلافاصله آنزيمهاي محلول انگل استخراج گرديد.

جهت استخراج پروتئينهاي محلول در آب ازجمله آنزيمها، از روش خردكردن انگل به‌روش ذوب و انجماد استفاده شد، بدين صورت كه بر روي رسوب به دست‌آمده انگل از محلول رقيق شده پايدارنده با غلظت ۲ ميلي مولار كه شامل دي‌تيوتريتول، اي‌آمينوكاپروئيك اسيد، ۲ سديم اتيلن دي‌آمين ترا استيك اسيد با غلظت۲۰۰ ميلي مولار و ۷ =PH بود و توسط آب مقطر رقيق‌شده، اضافه گرديد.

اين مخلوط در تانك نيتروژن مايع منجمد و سپس در آب۳۰ - ۲۵ درجة سانتيگراد ذوب مي‌گردد و اين عمل سه بار تكرار شد. مخلوط حاوي انگلهاي خرد شده توسط سانتريفوژ يخچال‌دار با دور g ۳۰۰۰۰ در ٤ درجة سانتيگراد به مدت ۳۰ دقيقة سانتريفوژ و محلول رويي كه شامل آنزيمها بودند، جمع‌آوري گرديد.

الكتروفورز و رنگ آميزي آنزيمها: از ٦ سيستم آنزيمي كه در فهرست آنزيمهاي پيشنهادشده توسط سازمان بهداشت جهاني و محققين مشهور اين رشته ارائه شده است، جهت شناسايي نمونه‌هاي انگل جداشده از منطقة آب و برق شهر مشهد استفاده شد (۱۹ - ۸).

اين آنزيمها با استفاده از روش الكتروفورز ايزوآنزيمها در ژل پلي‌آكريل آميد، مورد بررسي قرار گرفتند. با توجه به اختصاصي بودن هر آنزيم براي سوبستراو كوفاكتور، مي‌توان براي هر آنزيم روشي جهت ظهور باندهاي ايجاد شده روي ژل طراحي كرد.

شش سيستم آنزيمي شامل مالات دهيدروژناز[1]،گلوكز ٦ فسفات دهيدروژناز[2]، فسفوگلوكوموتاز[3] و گلوكز فسفات ايزومراز[4]، يك نوكلئوزيد هيدرولاز[5] و دو نوكلئوزيد هيدرولاز[6] مي‌باشند.

شاخصهاي يك زايموگرام در تعيين هويت نمونه‌هاي مختلف پس از الكتروفورز نمونه‌ها و رنگ آميزي با سيستمهاي آنزيمي ذكرشده، تعداد باندها، مهاجرت نسبي باندها، شدت باندها و ضخامت باندها بوده اند.

مشخصات فردی، نتايج آزمايشگاهی، سابقه بيماری در پرسشنامه ای جمع آوری گرديد.

اطلاعات جمع آوری شده با استفاده از آمار توصيفی و جداول توزيع فراوانی پردازش گرديد.

نتايج

۱- نتايج حاصل از مراحل كشت و انبوه سازی انگل: با بررسي نتايج آزمايش اسمير مستقيم و كشت، بيماران در ٤ گروه جداگانه جاي گرفتند.

گروه اول: در ۲۱ مورد گسترش مستقيم و كشت هردو منفي بودند.

گروه دوم: مواردي كه گسترش مستقيم مثبت و كشت پس از گذشت مدت‌زمان لازم منفي بود، ۲۲ مورد.

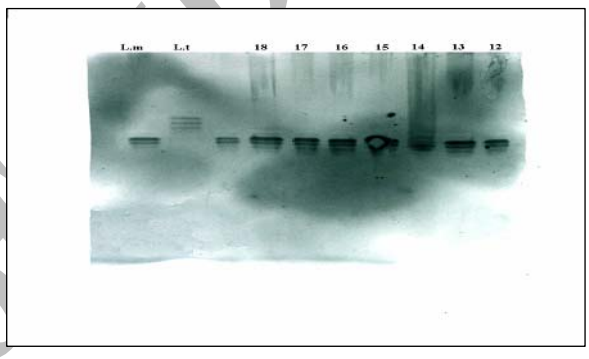
گروه سوم: در ۷ مورد گسترش مستقيم منفي و كشت مثبت بود.

گروه چهارم: در ۲۷ مورد گسترش مستقيم و كشت مثبت بود. اين گروه براي انجام مطالعه انتخاب و نهايتاً نمونه‌هاي ۱۸ نفر از بيماران اين گروه به توليد انبوه رسيد و براي مراحل بعدي مورد استفاده قرار گرفت.

[1] Malate dehydrogenase (MDH)
[2] Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)
[3] Phosphoglucomutase (PGM)
[4] Glucose phosphate isomerase (GPI)
[5] 1 Nucieoside hydrolase (NH_1)
[6] 2 Nucleoside hydrolase (NH_2)

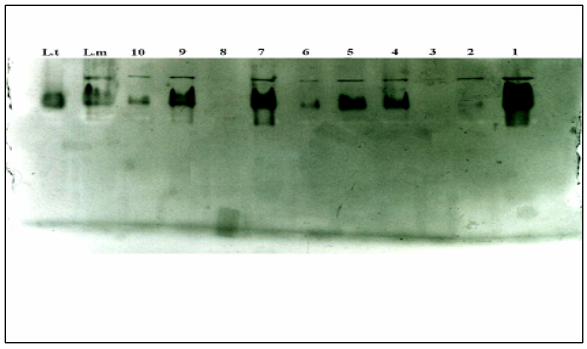
۲ - نتايج حاصل از مطالعة ايزوآنزيمهاي نمونه‌ها در مقايسه با گونه‌هاي استاندارد: ۱۸ نمونه در كنار نمونه‌هاي استاندارد ليشمانيا ميجر و ليشمانيا ترويپكا با استفاده از ٦ سيستم آنزيمي مورد مقايسه قرار گرفتند. نتايج به شرح زير است:

الف) مالات دهيدروژناز: در اين سيستم آنزيمي ليشمانيا ترويپكا و ليشمانيا ماژور كاملا از يكديگر متمايز بودند و تمامي ۱۸ نمونه در اين سيستم طرح كاملا مشابه هم و مشابه نمونة استاندارد ليشمانيا ميجر بودند (شكل ۱).



شكل ۱ – زايموگرام آنزيم MDH در نمونه های مورد مطالعه

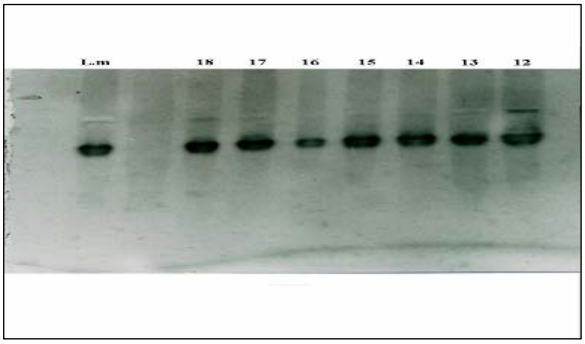
ب) گلوكز ٦ - فسفات دهيدروژناز: دو نمونة استاندارد به‌واسطة وجود تك‌باند سنگين با مهاجرت نسبي كند ليشمانيا ميجر، قابل افتراق بودند، ۱۸ نمونه الگوي مشابه با ليشمانيا ميجر را نشان دادند (شكل ۲).



شكل ۲ – زايموگرام آنزيم G6PD در نمونه های مورد مطالعه

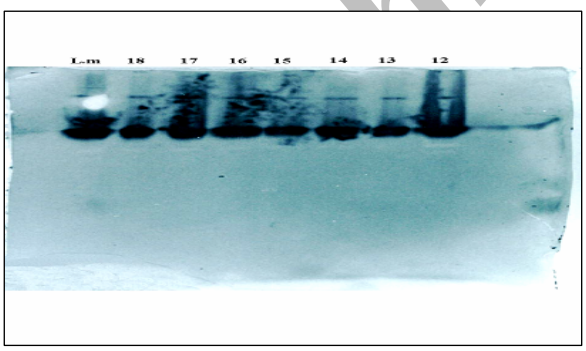
ج) فسفوگلوكوموتاز: ليشمانيا ميجر به‌واسطة وجود تك‌باند سنگين با مهاجرت نسبي كند و دو باند با مهاجرت نسبي بيشتر از ليشمانيا ترويپكا قابل افتراق بود.

در اين سيستم يكي از نمونه‌ها طرح متفاوتي از ساير‌ين داشت ولي ساير نمونه‌ها الگوي مشابه ليشمانيا ميجر نشان دادند (شكل ۳).



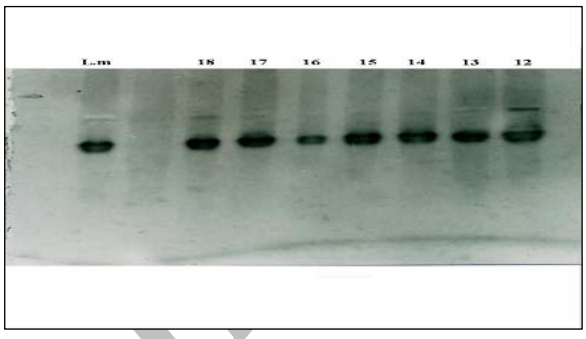
شكل ۳ - زايموگرام آنزيم PGM در نمونه های مورد مطالعه

د) گلوكز فسفات ايزومراز: در اين سيستم تمامي نمونه‌ها طرح مشابه نمونة استاندارد ليشمانيا ميجر داشتند (شكل ٤).



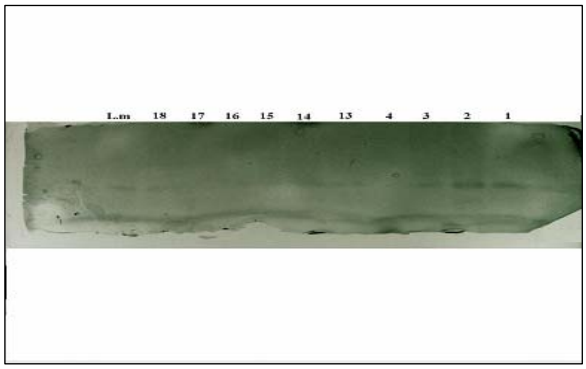
شكل ٤- زايموگرام آنزيم GPI در نمونه های مورد مطالعه

هـ) يك نوكلئوزيد هيدرولاز: طرح آنزيمي نمونة استاندارد ليشمانيا ميجر و ليشمانيا ترويپكا كاملا متفاوت بود. تمامي نمونه‌ها طرح مشابه ليشمانيا ميجر داشتند (شكل ٥).



شكل ٥ - زايموگرام آنزيم NH_1 در نمونه های مورد مطالعه

و) دو نوكلئوزيد هيدرولاز: يكي از نمونه‌ها در اين سيستم طرح متفاوتي با ساير نمونه‌ها داشت ولي ساير نمونه‌ها الگويي مشابه نمونة استاندارد ليشمانيا ميجر نشان دادند (شكل ٦).



شكل ٦ - زايموگرام آنزيم NH_2 در نمونه های مورد مطالعه

با توجه به ٦ سيستم آنزيمي مورد مطالعه، هر ١٨ نمونه، ليشمانيا ميجر شناخته شدند كه تنها يكي از نمونه‌ها با زايمودم متفاوتي از ليشمانيا ميجر شناسايي گرديد.

بحث و نتيجه‌گيری

بيماري ليشمانيوز از سوي سازمان بهداشت جهاني به عنوان يكي از شش بيماري مهم عفوني دنيا معرفي شده و تمركز تحقيقات پيرامون جنبه‌هاي مختلف آن توصيه و مورد تأكيد قرار گرفته است (١٩،٢٠).

اين بيماري در ايران نيز داراي پراكندگي وسيعي بوده و از مشكلات مهم بهداشتي كشور محسوب مي‌شود.

يكي از پيشرفتهايي كه در دهه‌هاي اخير در پزشكي كاربردي ايجاد شده، استفاده از ايزوآنزيمها در تحقيقات تحليلي مي‌باشد. مطالعة ايزوآنزيمها كاربرد وسيعي به عنوان يكي از روشهاي تشخيص مولكولي در جهت ميكروارگانيسم داشته است.

بررسي الكتروفورز ايزوآنزيمهاي ليشمانياهاي مختلف كه اولين بار توسط گاردنر[7] و همكارانش در سال ١٩٧٤ و با استفاده از يك سيستم آنزيمي صورت گرفت، تحول عظيمي در شناسايي گونه‌ها و سويه‌هاي مختلف انگلهاي جنس ليشمانيا ايجاد نمود.

در اين مطالعه از ٦ سيستم آنزيمي كه در فهرست آنزيمهاي پيشنهاد شده توسط سازمان بهداشت جهاني وجود دارند، براي شناسايي نمونه‌هاي انگل جداشده از منطقة آب و برق شهر مشهد استفاده شد (٢١،٢٢).

در بررسي ٦ سيستم آنزيمي و در مقايسه با سويه‌هاي مرجع ل. ترويپكا و ل. ميجر الگوي آنزيمي تمامي نمونه‌ها هموژن بود. سيستم آنزيمي مالات دهيدروژناز در تفكيك نمونه‌ها بسيار عالي عمل كرد.

در مجموع همة نمونه‌هاي تحت مطالعة طرح مشابه الگوي آنزيمي كه از منطقة آب و برق تهيه شده بودند، ل. ميجر نشان دادند.

[7] Gardner

در بررسي شواهد اپيدميولوژيك و باليني نيز نتيجة حاصل از مقايسة ايزوآنزيمها مورد تأييد قرار گرفتند.

در طي اين مطالعه تنها يك زايمودم متفاوت در ميان ساير نمونه‌ها مشاهده شد كه مي‌توان اين نمونه را زايمودم متفاوتي از ل. ميجر درنظر گرفت كه تعيين دقيق مشخصات اين زايمودم نيازمند به كارگيري سيستمهاي آنزيمي بيشتري مي‌باشد.

افزايش جمعيت، مهاجرت افراد غير ايمن و سكونت در منطقه‌اي كه شرايط پرورش و تكثير پشة خاكي از هر جهت فراهم بوده است، وجود لانه‌هاي جوندگان و افراد با زخمهاي درمان‌نشده و مزمن وجود زمينهاي بايز، شرايط مناسبي را جهت استقرار بيماري در اين ناحيه فراهم آورده است.

در شهر مشهد نيز بيماري در مناطق مختلف شهر مشاهده شده، اما در محله‌هاي شمال غربي و جنوب غربي به‌ويژه شهرك آب و برق رواج بيشتري دارد.

بعضي از روستاهايي كه مجاور شهر هستند نيز شديداً آلوده بودند.

از آنجا كه اولين گام در هرگونه برنامه‌ريزي جهت كنترل و مبارزه با توسعة بيماري در يك منطقه، تعيين مشخصات دقيق عوامل بيماري است كه از بيماران، مخازن يا ناقلين آن منطقه جدا شده باشند، نتايج به‌دست‌آمده از اين مطالعه كه براي اولين مرتبه در اين سطح صورت پذيرفت، مؤيد اين واقعيت بود كه شهر مشهد نه تنها يكي از كانونهاي اصلي ليشمانيوز جلدي نوع شهري مي‌باشد بلكه در برخي از مناطق شهر به ويژه در حواشي آن گونه‌هاي ليشمانيا ماژور كه عامل نوع مرطوب است نيز وجود دارد.

****

References:

1- Hejazi H., Nasrifar P., Jamali S., Jahangirnejad A.A., and Khamesipour A.: Identification of leishmaniasis species using monoclonal antibodies in Isfahan. Arch. Ira. Med, 2001; 4: 101-102.
2- Nadim A., and Tahnildar-Bidruni, Gh.: Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Afghanistan, part II : Anthroponotic cutaneous leishmaniasis. Bull. Soc. Path. Exot ,1977; 72: 461 - 466.
3- W.H.O.: Control of Tropical Disease, The leishmaniasis, 1993; 14 PP.
4- Gardner P.J., M.L Chance., and Peters W. Biochemical taxonomy of leishmania. II. Electrophoretic variation of MDH. Ann. Trop. Med. Parasito, 1974; 68: 317 - 325.
5- Hunter R.L., Markert, C.L.,: Histochemical demonstration of enzymes seprated by 20 electrophoresis in starch gels. Science, 1957; 125: 1294 -1295.
6- Kino K.N., Baydoun E., Tawk R., Nuwayri-Salti H.: Isoenzyme characterization of leishmania isolates from Lebnon and Syria. AM. J. Trop. Med. Hyg, 2000; 63 (1,2): 43 - 47.
7- Martin-Sanchez J., Gramicca M., Dimuccio T., Ludovisi A. Morillas-Marquez F.: Isoenzymatic polymorphism of Leishmania infantum in southern Spein. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg, 2004; 98(4): 228 – 232.
۸ – حاتم، غلامرضا. تعیین انگل لیشمانیا با روش ایزوآنزیم الکتروفورز. پایان‌نامة دکتراي تخصصي .ph.D رشتة انگل‌شناسي. دانشگاه تربیت مدرس، ۱۳۷۵.
9- N.K., AL-Hussayni Rassam M.B., Jawdat S.Z., Wahid F.N.: Numerical taxonomy of some old world leishmania species. Trans. R. Soc. Trop. Med, 1987; 81: 581-586.
10- Al. Taqi M., Evans D.A.: Characterization of Leishmania spp. From duwiat by isoenzyme electrophoresis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg, 1987; 72: 56 – 65.
11- Banuls A.L., Hide M., Tibayrenc M.: Evolutionary genetics and molecular diagnosis of Leishmania species. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg, 2002; 96: 9 -13.
12- Cupolillo E., et al.: Genetic polymorphism and molecular epidemiology of Leishmania (Viannia) braziliensis from different host and geographic areas in Brazil. Journal. Clinical. Microbiology, 2003; 41(7): 3126- 32.
13- Evans D.A.: Handbook on isolation, characterization and cryopreservation of leishmania UNDP/World Bank/WHO special program for research and training. In Tropical Disease (TDR). 1211 Geneva, Switzerland, 1989.
14- Kreutzer R.D., Soaraty N., Semko M.E.: Biochemical identities and differences among leishmania species and sub species. Am. J. Trop. Med. Hyg, 1987 36(7): 22 – 32.
15- Le Blancq S.M., Lanham S.M., and Evans, D.A 1987: Comparative isoenzyme profiles of old and new world leishmania, In: Peters, W. Killick-Kendrick, R. (eds): The Leishmania in Biology and Medicine. London: Academic press, 1987; 1: 543-550.

16- Le Blancq S.M. and Peters M.: Leishmania in the old world: 4.The distribution of L. donovani sensu lato zymodemes. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg, 1986; 80, 367-377.
17- Mebrahtu Y., Oster C.N., Shatry A.M., Hendricks L.D., Githure J.I., Rees P.H., Perkins P.V., Leeuwenburg. J.: Cutaneous leishmaniasis caused by leishmania tropica in Kenya. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg, 1987; 81: 923-924.
18- Miles M.A., Lanham S.M., Souza A.A., De Povoa M.M.: Further enzymic characters of Trypanosoma cruzi and their evaluation for stranin identification. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg, 1980; 74: 221- 237.
19- Rafati S., Salmanian A.H., Hashemi K., Schaff C., Belli S., Fasel N.: Identification of Leishmania major cystein proteinases as targets of the immune respons in humans. Mol. Biochem. Parasitol, 2001; 113(1): 35 - 43.
20- World Health Organization, Control of the leishmaniasis, Technical Report Series 793, Geneva, W.H.O., 1990.
21- Evans D.A., Lanham S.M., Baldwin C.I., Peters. W.: The isolation and isoenzyme characterization of Leishmania braziliensis subsp. from patients with cutaneous leishmaniasis aquired in Belize. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg, 1984; 78: 35- 42.
22- Mebrahtu, Y.B., Lawyer P.G., Pamba H., et al.: Biochemical characterization and zymodem classification of leishmania isolates from patients, vector and reservoir hosts in Kenya. Am.J. Trop. Med. Hyg, 1992; 47(6): 252-92.