Archive of SID

تعیین هویت گونه های لیشمانیای جداشده از بیماران مبتلا به سالک در منطقه قهاب محمدآباد اصفهان با استفاده از PCR

دکتر سیدحسین حجازی[۱]، کبری مختاریان[۲]، گیلدا اسلامی[۳]، دکتر رسول صالحی[۴]، دکتر محمدعلی نیلفروش زاده[۵]، لیلا شیرانی[۶]، صدیقه صابری[۶]

۱-دانشیار، ۲- کارشناس ارشد، ۳- دانشجوی PhD، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ۴-دانشیار، گروه ژنتیک بیولوژی مولکولی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ۵- استادیار، مرکز آموزش و پژوهش بیماری های پوست و جذام، دانشگاه علوم پزشکی تهران و مرکز تحقیقات بیماری های پوست و سالک، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ۶- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات بیماری های پوست و سالک دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

زمینه و هدف : لیشمانیوز جلدی یکی از بیماری‌های پوستی شایع در ۸۸ کشور جهان است. اصفهان و برخی از مناطق مجاور آن سال‌ها جزو مناطق هایپرآندمیک (سالک) شناخته شده‌اند و اخیراً در برخی از مناطق مجاور آن به صورت نوپدید گزارش می‌شود که تعیین هویت انگل برای مشخص‌سازی وضعیت اپیدمیولوژی بیماری و برنامه‌های کنترلی امری ضروری است . این مطالعه با هدف تعیین مشخصه های گونه‌های انگل لیشمانیا در کانون‌های اندمیک جدید اصفهان با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) صورت گرفت.

روش اجرا : از محل ضایعه‌های بیماران نمونه‌های بافتی در محیط کشت N.N.N کشت داده شد. سپس پروماستیگوت‌های مرحله ایستا را برداشت و DNA انگل با روش فنل – کلروفرم تخلیص شد. با استفاده از تکنیک PCR و پرایمرهای مناسب تکثیر DNA مورد نظر صورت پذیرفت. محصول به دست آمده هم زمان با محصول DNA تکثیر شده سویه‌های استاندارد، الکتروفورز شد و پس از مقایسه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته ها : از کل جمعیت ۱۸۴۴۷ نفری مورد بررسی ۴۳ نفر واجد زخم مشکوک به لیشمانیوز جلدی بودند که از بین آن‌ها ۱۸ مورد انگل به طور کامل ایزوله شد. نتیجه حاصل از تکثیر DNA این ایزوله‌ها از طریق مشاهده باندهای ا لکتروفورز شده روی ژل آگاروز ۱ درصد صورت گرفت و باندهای حاصل با باندهای حاصل از سویه‌های استاندارد مقایسه شد و در نتیجه مشخص شد تمامی انگل‌های جدا شده لیشمانیا ماژور هستند.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه لیشمانیا ماژور را عامل لیشمانیوز جلدی در ساکنان شرق منطقه قهاب محمدآباد مشخص کرد. مطالعه‌های وسیع‌تری لازم است تا بتوان با قطعیت اعلام کرد تنها گونه عامل سالک در این منطقه لیشمانیا ماژور است.

واژه های کلیدی : واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، تعیین هویت، لیشمانیوز

وصول مقاله : ۸۵/۱۰/۲۰ پذیرش: ۸۵/۱۲/۱۳ فصلنامه بیماری های پوست پاییز ۱۳۸۶؛ دوره ۱۰(۳): ۲۲۹-۲۳۵

مقدمه

لیشمانیوز جلدی یکی از بیماری‌های پوستی شایع در ۸۸ کشور جهان است که از سوی سازمان بهداشت جهانی در زمره شش بیماری مهم انگلی قرار گرفته است. اگر چه سالانه یک و نیم میلیون مورد بیماری به طور رسمی گزارش می شود ولی تعداد واقعی موارد بیماری در طول بیش از دو میلیون نفر

مؤلف مسوول: دکتر سیدحسین حجازی – اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی

پست الکترونیک : hejazi@med.mui.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

تخمین زده می‌شود(۱). از دو میلیون نفر موارد جدید، یک و نیم میلیون نفر به لیشمانیوز جلدی مربوط است که ۹۰ درصد از ایران، افغانستان، عربستان سعودی و سوریه گزارش می شود(۳و۲). متأسفانه در سال های اخیر تعداد موارد بیماری در ایران رو به افزایش بوده است و در بسیاری از مناطق کشور به صورت اندمیک دیده می‌شود(۴). انتشار جغرافیایی بیماری به عوامل گوناگونی وابسته است که از جمله مهم‌ترین این عوامل وجود شرایط اقلیمی مناسب (آب، هوا، گرما، رطوبت)، میزبانان واسط لازم، مخازن و ... را می‌توان نام برد(۵).

سالک به دو شکل خشک یا شهری Anthroponotic Cutaneous Leishmaniasis (ACL) و مرطوب یا روستایی Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis (ZCL) بروز می‌کند. در اکثر موارد عفونت، بعد از چند ماه تا یک سال بهبود می‌یابد، اما درصدی از موارد دارای دوره‌ای چند ساله حتی بیش‌تر از ده سال می‌شود. در موارد زیادی نیز به دلیل عفونت های ثانویه قارچی و باکتریایی به سیری چند ساله منجر می شود(۶). این مسایل در مناطق آندمیک روستایی ایران که دارای سطوح بهداشتی بالینی هستند، دارای اهمیت بسیاری است. به دلیل همین مخاطرات، سازمان جهانی بهداشت برای مبارزه و کنترل این بیماری اهمیت خاصی را قایل است و آن را جزو یکی از اولویت‌های برنامه خود قرار داده است(۷).

برای دستیابی به هدف کنترل مؤثر هر عفونتی تعیین مشخصه های عامل آن، جزو اساسی‌ترین فاکتورهای مورد توجه است. تعیین ویژگی های ایزوله‌ها در ایران عمدتاً با توجه به انتشار جغرافیایی سویه‌های انگل، نوع مخزن، علایم بالینی، محل استقرار انگل در سیستم گوارشی پشه‌های خاکی بوده است که این روش‌ها قطعی، تعیین کننده و کامل نیستند(۸). در مطالعه‌های سال‌های اخیر از روش‌های پیش‌رفته مولکولی استفاده شده است. از طرفی روش‌های سرولوژی معمول نیز به علت وجود واکنش های متقاطع بین آنتی‌ژن‌های لیشمانیا و تعدادی از میکروارگانیسم‌ها نظیر پلاسمودیوم، تریپانوزوم و مایکوباکتریوم فاقد حساسیت کافی است (۹). لذا امروزه در دنیا این روش‌ها به تنهایی مورد قبول نیستند و در کنار آن‌ها روش‌های دقیق‌تری که مستلزم مطالعه‌های مولکولی، نظیر روش ایزوآنزیم‌ها، کاوشگرهای DNA (DNA probes) و پادتن‌های تک دودمانی است استفاده می‌شود(۹). در برخی از موارد، گونه‌هایی از انگل جهت شناسایی به مراکز پیش رفته در کشورهای اروپایی و امریکایی ارسال شده است. از این جهت تداوم و توسعه روش های مولکولی برای بررسی و مطالعه این بیماری‌ها در وطن عزیزمان از ضروریات است.

PCR به عنوان یکی از روش‌های مولکولی، به طور گسترده در تشخیص بیماران مبتلا به سالک (۱۰) و لیشمانیوز احشایی به کار رفته است(۱۱). هم چنین این روش برای کشف انگل در نمونه‌های تهیه شده از انسان و سگ‌های مشکوک به لیشمانیازیس با موفقیت به کار رفته است(۱۲). با مطالعه‌های مقدماتی که در این زمینه صورت گرفته است تصمیم گرفته شد تا از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) به عنوان یک راه بسیار مؤثر، حساس و اختصاصی(۱۳)، برای تعیین مشخصه های گونه‌های انگل لیشمانیا در کانون‌های آندمیک جدید اصفهان استفاده شود. به خصوص این که با توجه به پتانسیل این روش در تعیین گونه‌ها با سرعت مناسب می‌توان چهره اپیدمیولوژی بیماری را در مناطق نو پدید بر اساس گونه عامل مشخص کرد.

روش اجرا

این مطالعه از مهرماه تا بهمن ماه سال ۱۳۸۴ روی افراد ساکن در منطقه قهاب محمدآباد اصفهان، صورت گرفت که دارای ضایعه جلدی مشکوک به لیشمانیوز بوده‌اند. در بازدید خانه به خانه اهالی این منطقه ۱۸۴۴۷ نفر از نظر وجود زخم مورد بررسی

www.SID.ir

Archive of SID

قرار گرفتند. از بین افراد معاینه شده ۴۳ نفر واجد ضایعه مشکوک به سالک بودند که از آن‌ها اسمیر مستقیم تهیه و بخشی از آن در محیط N.N.N کشت داده شد. لام ها با گیمسا رنگ آمیزی و از نظر وجود جسم لیشمن بررسی شد. محیط‌های کشت نیز از نظر وجود پروماستیگوت لیشمانیا مورد بررسی قرار گرفت و برای ایزولاسیون پرولاسیون پروماستیگوت انگل به محیط کشت RPMI 1640 منتقل و به تولید انبوه رسانده شد.

نمونه‌های کشت شده ی انگل با روش فنل – کلروفرم به مرحله استخراج DNA رسید. هر نمونه سه بار با PBS شست و شو داده شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر نمونه با ۹۰۰ میکرولیتر محلول لایزمیکرولیتر پروتئیناز k، ۱۰ میکرولیتر RNAase مخلوط کرده و به مدت ۲ ساعت در ۶۰ درجه سانتی گراد به حالت Rotating قرارداده شد و بعد از آن، ۵۰۰ میکرولیتر فنل متعادل شده به آن اضافه و به آرامی مخلوط و با دور ۱۲ هزار در دقیقه به مدت ۵ دقیقه در حرارت اتاق سانتریفیوژ شد. فاز بی رنگ بالایی ایجاد و به ویال اپندورف استریل انتقال داده شد و به آن ۲۵۰ میکرولیتر فنل متعادل شده و ۲۴۰ میکرولیتر کلروفرم و ۱۰ میکرولیتر ایزوآمیل الکل اضافه و به آرامی مخلوط و سپس به مدت ۳ دقیقه با دور ۱۲ هزار در دقیقه سانتریفوژ شد. مایع بی رنگ رویی به اپندورف استریل دیگری انتقال یافت و مجدداً ۵۰۰ میکرولیتر کلروفرم به آن اضافه و به آرامی مخلوط و سپس یک دقیقه با دور ۱۲ هزار در دقیقه سانتریفوژ شد. مجدداً مایع بی‌رنگ رویی به اپندورف استریل انتقال یافت و به آن ۵۰ میکرولیتر استات سدیم ۳ مولار و ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول ۲۰- درجه اضافه شدو ۳۰ دقیقه روی یخ انکوباسیون صورت گرفت. سپس حاصل کار در دمای ۴ درجه، دور ۱۴ هزار در دقیقه به مدت ۴۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و در این مرحله مایع رویی کاملاً دور ریخته و به آن ۲۵۰ میکرولیتر اتانول با دمای ۲۰- درجه اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۴ هزار در دقیقه با سانتریفیوژ یخچال‌دار در دمای ۱۴ درجه سانتریفیوژ شد. مجدداً محلول رویی دور ریخته و در دمای ۴۵ درجه در شرایط خلاء سانتریفیوژ و سپس ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر استریل به آن اضافه شد. محتوی حاصل ورتکس و یک ساعت در ۵۶ درجه یا ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه قرار داده شد و سپس به یخچال ۲۰- درجه انتقال یافت و تا زمان استفاده نگه داری شد(۱۴).

مواد لازم به ازای هر نمونه در PCR و توالی پرایمرهای مورد استفاده به صورت زیر بود:

MgCl2=0.7µl, dNTP=0.5µl,
PCR buffer = 2.5µl, Primer =1.25+1.25µl
DNA (sample)=1µl, DDW=17.25µl
Primer 1:5'-TCG CAG GCC CCT ACC
Primer 2:5'-AGG GGT TGG TGT AAA ATA GGC

این پرایمرها باتوجه به توالی مینی سیرکل kDNA از لیشمانیا ماژور توسط مهبودی طراحی و مطالعه شده است(۱۵).

برنامه PCR به صورت زیر اجرا شد:

برنامه اول

۴ دقیقه: ۹۳ درجه سانتی گراد ۱ سیکل

برنامه دوم:

۱-۳۰ ثانیه : ۹۳درجه سانتی گراد ۳۰ سیکل

۲-۶۰ ثانیه : ۶۴ درجه سانتی گراد

۳-۹۰ ثانیه :۷۲ درجه سانتی گراد

برنامه سوم:

۱-۵ دقیقه : ۷۲ درجه سانتی گراد ۱ سیکل

محصول PCR به دست آمده روی ژل آگاروز یک درصد همراه با اتیدیوم برماید رنگ‌آمیزی و الکتروفورز شد و از طریق دستگاه Gel document مشاهده باندها صورت گرفت. با توجه به یافته‌های به دست آمده از طریق نرم‌افزار SPSS با استفاده از آزمون مربع کای و آزمون t رابطه بین متغیرها مشخص شد.

www.SID.ir

Archive of SID

یافته ها

از بین ۱۸۴۴۷ مورد بررسی شده ۴۳ نفر دارای ضایعه مشکوک جلدی بودند که در ۱۸ نفر از آن‌ها اسمیر و کشت از نظر جسم لیشمن منفی بود. در ۲۵ نمونه باقی مانده ۷ نمونه به دلیل آلودگی شدید قارچی حذف شد و ۱۸ نمونه پس از ایزولاسیون انگل از محیط کشت، با روش PCR مورد بررسی قرار گرفت.

از ۱۸ نمونه PCR شده با توجه به الگوی الکتروفورز، محصول به دست آمده در تمامی نمونه‌ها قطعه باندی به اندازه ۱۲۶۷bp حاصل شد که با نمونه لیشمانیای ماژور استاندارد که قطعه‌ای به اندازه ۱۲۶۷bp بود مطابقت داشت. در نتیجه همه ی موارد جدا شده به عنوان لیشمانیا ماژور گزارش شد (تصویر شماره ۱a و ۱b)

چاهک ۱-کنترل منفی،چاهک، ۲- لیشمانیا ماژور ، چاهک ۳- لیشمانیا تروپیکا، چاهک ۴-لیشمانیا اینفانتوم، چاهک ۵ تا ۱۷- نمونه‌های بیماران شماره ۱ تا ۱۳

چاهک ۱- کنترل منفی، چاهک ۲- لیشمانیا ماژور، چاهک ۳- لیشمانیا تروپیکا، چاهک ۴- لیشمانیا اینفانتوم، چاهک ۵ تا ۹- نمونه‌های بیماران شماره ۱۴ تا ۱۸

تصاویر شماره ۱a و ۱b- الکتروفورز نمونه‌های جدا شده از بیماران مبتلا به سالک پس از PCR روی ژل آگاروز ۱ درصد

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

منطقه مورد مطالعه یعنی قهاب محمدآباددر شمال شرقی اصفهان واقع شده که از شمال با بخش برخوار و از شرق با خوراسگان و بخش کوهپایه و از غرب با محدوده ی استحفاظی شهر اصفهان و از جنوب با دهستان‌های جی و براآن هم جوار است. آب و هوای آن شبیه اصفهان و مانند دیگر نقاط مرکزی کشور خشک و بیابانی است و هر چه به سمت شرق پیش می رویم از حاصل‌خیزی خاک کاسته می شود و حالت کویری خشک به خود می‌گیرد ولی رطوبت نسبی آن نسبت به ناحیه کویری بیش‌تر است. پوشش گیاهی آن به واسطه نبودن آب و شوری خاک فقیر است. موضع طبیعی این دهستان به صورت دشت و ناهمواری‌هایی به صورت پراکنده و منفرد و کم ارتفاع در نزدیکی مرکز دهستان به چشم می‌خورد. شغل مردمان این دهستان، کشاورزی و دامپروری است و هم چنین کوره‌های آجرپزی نیز در قسمت شرق آن واقع شده که این مکان‌ها محیط مناسبی را برای جونده مخزن و ناقل انگل لیشمانیا فراهم می‌کند، که به سازی محیط در این منطقه می‌تواند در زمینه ی پیش-گیری، بسیار کمک کننده باشد (تقسیمات کشوری استانداری استان اصفهان).

تجارب محققان اپیدمیولوژی نشان می‌دهد که انتخاب روش صحیح کنترل، مبارزه و ریشه کنی لیشمانیوز با میزان شیوع و بروز گروه‌های در معرض خطر، نوع کانون بیماری، گونه‌های ناقل و مخزن بیماری و از همه مهم‌تر شناسایی انگل در حد گونه بستگی دارد، زیرا استراتژی‌های کنترل و پیش‌گیری در مقابل لیشمانیوز جلدی شهری و روستایی با یک دیگر تفاوت عمده‌ای دارد که بر اساس نتایج این تحقیق می‌توان برنامه‌های پیش‌گیری از بیماری را پیشنهاد کرد و موجب کاهش موارد بیماری در آینده شد.

در این مطالعه ۱۸ بیمار از روستای قهاب محمدآباد مورد بررسی قرار گرفتند و تعیین گونه آن‌ها با استفاده از تکنیک PCR اجرا شد. در مقایسه با روش‌های رایج در تشخیص گونه-های عامل لیشمانیوز جلدی تکنیک PCR به عنوان یک عامل تشخیصی با حساسیت بسیار بالا مطرح بوده است(۱۷).

kDNA در لیشمانیا، دارای نواحی Variable و Conserved است که از آن‌ها به عنوان شاخصی برای تعیین گونه استفاده می‌شود. با توجه به هتروژن بودن منطقه mini-circle در kDNA در لیشمانیا انتظار می‌رود که بتوان مناطق تکثیر شده متفاوتی را مشاهده کرد. در مطالعه مهبودی با استفاده از پرایمرهای مزبور تکثیر دو قطعه به اندازه‌های ۸۵۰ و ۶۲۰bp بیان گر لیشمانیا ماژور سوش (MRHO/IR/64/ Nadim-1strain) و تکثیر یک قطعه به اندازه ۶۲۰bp بیان گر لیشمانیا ماژور سوش Pstrain بود(۱۵). طی مطالعه‌ای که با استفاده از این پرایمر در سودان صورت گرفت تکثیر قطعه‌ای به اندازه تقریباً ۷۰۰bp بیانگر گونه ماژور انگل لیشمانیا بود(۱۶).

در این مطالعه با استفاده از پرایمر مزبور که روی سویه‌های استاندارد L.major(MRHO/IR/75/ER)، L. tropica (MHOM / IR / NADIM3) و L. infantum (MHOM/TN/80/IPT1) اجرا شد، تکثیر قطعه‌ای با اندازه ۱۲۶۷bp بیان گر لیشمانیا ماژور، تکثیر دو قطعه به اندازه‌های ۱۲۹۶ و ۵۸۰bp بیان گر لیشمانیا تروپیکا و تکثیر سه قطعه به اندازه‌های ۱۴۱۹ و ۷۸۱ و ۶۳۰bp بیان گر لیشمانیا اینفانتوم بوده است. تفاوت موجود در قطعات تکثیر شده در مطالعه حاضر و هر یک از مطالعه‌های فوق احتمالاً به دلیل استفاده از سویه‌های مختلف در هر یک از مطالعه‌های مزبور است. همان طور که عنوان شد گونه عامل بیماری لیشمانیوز جلدی در تمام بیماران تحت مطالعه ماژور گزارش شد. با توجه به بومی بودن افراد و نبود سابقه مسافرت قبلی افراد مبتلا می‌توان نتیجه گرفت که بیماری لیشمانیوز جلدی در این منطقه به صورت Autochthonous است.

www.SID.ir

Archive of SID

در مطالعه‌ای که توسط یاران در سال ۷۵-۱۳۷۴ صورت گرفت ۸۲/۱ درصد لیشمانیا ماژور و ۱۷/۹ درصد لیشمانیا تروپیکا شناسایی شد(۱۷). صادقیان در سال ۱۳۸۱ از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان امین ۱۲/۲ درصد لیشمانیا تروپیکا و ۸۷/۸ درصد لیشمانیا ماژور گزارش کرد(۱۸). این بیماران مربوط به مناطق و شهرستان‌های مختلف اصفهان نظیر: ملک شهر، اصفهان، حبیب آباد، کوهپایه، خورزوق، دولت آباد، گز، میه، نجف آباد، فلاورجان و شهرک کاوه بودند. جمالی در سال ۱۳۷۷ در بیماران واکسینه شده و غیر واکسینه مناطق مختلف اصفهان گونه غالب را لیشمانیا ماژور گزارش کرد(۱۹).

تشکر و قدردانی

به این وسیله نویسندگان، مراتب سپاس خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به دلیل حمایت مالی از این طرح، مرکز تحقیقات بیماری‌های پوستی و سالک و پرسنل محترم آن و انستیتو پاستور تهران برای در اختیار قرار دادن سوش L.infantum اعلام می‌دارند.

References

1-WHO control of Tropical Disease. The Leishmaniasis WHO/C.T.D/I.C.O (2000).

2-Desjeux P. Human leishmaniasis. Epidemiology and public health aspects. WLD.HLth. State Q. 1992; 45: 267-75.

3-Desjeux P. Information epidemiology and control of leishmaniasis by country or territory. WHO/LELSH/1997; 91: 30-47.

۴-گوشه گیر ا، هوشمند ب، شریفیان ج، زینلی م. برنامه اجرایی پیشگیری و مراقبت بیماری لیشمانیوز جلدی و احشایی در کشور. وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، معاونت امور بهداشتی اداره کل پیشگیری و مراقبت از بیماری‌ها. ۱۳۷۶.

5-Salah M, Salman MD. Cutaneous leishmaniasis: Clinical features and diagnosis. J Clin Dermatol 1999; 17: 291-96.

6-Report of WHO Expert Committee. Control of Cutaneous Leishmaniasis. WHO Technical Report Series. Geneva:1991; 793.

7-Ozbel Y, Turgay N, Ozensoy S. Epidemiology, diagnosis and control of leishmaniasis in the Mediterranean region. Annal Trop Med Parasitol 1995; 89: 89-93.

8- Pratt DMM, Wirth DF. Rapid identification of Leishmania species by specific hybridization of kinetoplast DNA. Cutaneous Leishmaniasis. Proc Natl Acad Sci 1982; 79: 6999-7003.

9-Kreutzer RD, Corredor A, Grimaldi G, Morales A. Characterization of Leishmania colombiensis sp: a new parasite infecting humans, animals and phlebotomine sand flies in Colombia and Panama. Am J Trop Med Hyg 1994; 44: 662-75.

10-Schubach A, Haddad F. Detection of Leishmania DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. J Infec Dis 1998; 178: 911-14.

11-Wilson SM. DNA- based methods in the detection of Leishmania parasites: field application and practicalities. Annual Trop Med Parasitol 1995; 89: 95-100.

12-Bruijin de Maarten HL, Barker Doglas C. Diagnosis of new world leishmaniasis: specific detection of species of the Leishmania braziliensis complex by amplification of kinetoplast DNA. Acta Tropica 1992; 52: 45-48.

13-Harris E, Kropp G, Belli A, et al. Step multiplex PCR assay for characterization of new world Leishmania complex. J Clin Microbiol 1998; 36: 1989-95.

www.SID.ir

Archive of SID

14-Dudenhausen JW. PCR diagnosis of Leishmania in Israel and West bank: development of a field applicable procedure useful for epidemiological studies. (dissertation). Jarusalem: The Kuvin Center for the study of infectious and Tropical Diseases . The Hebrew University, Hadassah Medical school; 2003.

15-Mahboudi F, Abolhassani M, Yaran M, et al. Identification and differentiation of Iranian Leishmania species by PCR amplification of kDNA. Scand J Infect Dis 2001; 33: 596-98.

16-Andresen K, Gaafar A, El-Hassan AM, et al. Evaluation of the polymerase chain reaction in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to Leishmania major: A comparison with direct microscopy of smears and sections from lesion. Trans R Soc Trop Med Hyg 1996; 90: 133-35.

۱۷-یاران م. تعیین هویت گونه‌های عامل لیشمانیوز جلدی با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در شهرستان اصفهان، پایان نامه جهت اخذ دکترای حرفه‌ای علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، ۷۵-۱۳۷۵.

۱۸-صادقیان ب. بررسی هویت انگل لیشمانیا در اشکال بالینی غیرمعمول لیشمانیوز جلدی با استفاده از روش‌های مولکولی در بیماران مراجعه کننده به مرکز تحقیقات پوست و سالک مرکز پزشکی امین. پایان نامه برای اخذ دکترای حرفه‌ای پزشکی نجف آباد، دانشگاه آزاد اسلامی نجف آباد، ۱۳۸۱.

۱۹-جمالی س. بررسی کارایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در تشخیص و تعیین گونه لیشمانیا در افراد واکسینه و غیرواکسینه. پایان نامه دکترای حرفه ای علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، تیرماه ۱۳۷۷.

www.SID.ir