

تعیین هویت انگل لیشمانیا با استفاده از تکنیک PCR-RFLP در لام های رنگ آمیزی شده مربوط به بیماران و جوندگان مخزن لیشمانیوز جلدی در شهرستان دامغان

صادق محمدی ازنی*، دکتر یاور راثی**، دکتر محمدعلی عشاقی***، دکتر محمدرضا یعقوبی ارشادی**
دکتر مهدی محبعلی****، محمدرضا عبایی*****، دکتر هما حجاران*****، زینب نوکنده*****

دریافت: ۸۹/۵/۲، پذیرش: ۸۹/۸/۳۰

چکیده:

مقدمه و هدف: لیشمانیوز یکی از مهمترین بیماری های عفونی جهان می باشد. این بیماری در بیش از نیمی از استان های ایران به عنوان مشکل بهداشتی مطرح می باشد. تشخیص مخازن بیماری و همچنین تعیین هویت نوع انگل در انسان در شناسایی جنبه های اپیدمیولوژیک بیماری و ارائه برنامه کنترل اهمیت زیادی دارد.

روش کار: این مطالعه توصیفی در سال ۱۳۸۷ با استفاده از تکنیک PCR-RFLP در شهرستان دامغان انجام شده است. بررسی بر روی لام های رنگ آمیزی شده با گیمسا مربوط به بیماران مشکوک به سالک و همچنین جوندگان صید شده در روستاهای آلوده که از نظر اجسام لیشمن مثبت بوده اند انجام شده است. DNA انگل از روی لام ها استخراج و با استفاده از پرایمر های اختصاصی لیشمانیا جهت تکثیر قطعه ITS1 با روش Conventional PCR آزمایش شده اند و محصولات PCR تحت هضم آنزیمی (HaeIII) قرار گرفته اند.

نتایج: ۲۵ نمونه انسانی و ۸ نمونه از جوندگه رومبومیس اپیموس مورد آزمایش PCR-RFLP قرار گرفتند. پس از الکتروفورز محصولات واکنش مشخص شد که انگل موجود در لام های انسانی و جوندگان، لیشمانیا ماژور (عامل لیشمانیوز جلدی روستایی) می باشد.

نتیجه نهایی: تکنیک PCR-RFLP روش موثری جهت تعیین گونه انگل لیشمانیا در لام های رنگ آمیزی شده با گیمسا که از انسان و مخازن حیوانی گرفته شده می باشد و از مزایای این روش این است که بدون انجام تعیین توالی، تشخیص گونه های انگل لیشمانیای ایجاد کننده بیماری امکان پذیر می گردد.

کلید واژه ها: سالک / لیشمانیا / واکنش زنجیره ای پلیمرز

مقدمه:

۱۰ گونه از نظر پزشکی و دامپزشکی اهمیت دارند (۱).
تظاهرات این بیماری به سه شکل اصلی جلدی، احشایی و جلدی-مخاطی قابل مشاهده است (۲). به علت اهمیتی که این بیماری از نظر بهداشتی دارد، همواره مورد توجه سازمان جهانی بهداشت بوده است. در حال حاضر

لیشمانیوزها (Leishmaniose) مجموعه ای از بیماریها هستند که توسط گروهی از انگل های داخل سلولی مربوط به جنس لیشمانیا (Leishmania) ایجاد می شوند. از بین ۳۰ گونه انگل لیشمانیای شناسایی شده، حدود

* کارشناس ارشد حشره شناسی پزشکی مرکز بهداشت دامغان دانشگاه علوم پزشکی سمنان (sadegh_azni@yahoo.com)

** استاد گروه حشره شناسی پزشکی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

*** دانشیار گروه حشره شناسی پزشکی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

**** استاد گروه انگل شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

***** عضو هیأت علمی گروه حشره شناسی پزشکی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

***** دانشیار گروه انگل شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

***** کارشناس میکروبیولوژی مرکز بهداشت دامغان دانشگاه علوم پزشکی سمنان

حداقل ۸۸ کشور جهان در قاره های آسیا، اروپا، آفریقا و آمریکا به انواع مختلف این بیماری آلوده می باشند. شیوع آن ۱۴-۱۲ میلیون مورد گزارش شده است و میزان بروز سالانه آن حدود ۲-۱/۵ میلیون مورد است (۳،۴).

لیثمانیوز در بیش از نیمی از استان های کشور ایران وجود دارد و سالانه بیش از ۲۰ هزار مورد بیماری گزارش می شود (۵).

لیثمانیوز جلدی در ایران به دو شکل خشک (شهری) و مرطوب (روستایی) دیده می شود. در نوع روستایی که در اثر لیثمانیا مازور بوجود می آید جوندگان به عنوان مخزن مطرح هستند و ناقل اصلی بیماری پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی است اما در نوع شهری که عامل آن لیثمانیا تروپیکا است مخزن اصلی بیماری انسان و ناقل اصلی فلبوتوموس سرژانتی می باشد (۲،۶،۷). با توجه به خصوصیات بیولوژیک انگل، مخازن و ناقلین روش های مبارزه با این دو نوع بیماری متفاوت می باشد لذا شناسایی گونه انگل و در نهایت نوع بیماری در برنامه ریزی های بهداشتی اهمیت بسزایی دارد (۲،۸).

با مشاهدات میکروسکوپی لامهای رنگ آمیزی شده با گیمسا می توان به وجود آلودگی و حضور انگل پی برد اما شناسایی دقیق گونه انگل امکان پذیر نمی باشد (۹،۱۰). روش های مولکولی در تشخیص بیماری لیثمانیوز و شناسایی گونه های انگل در سال های اخیر بسیار رواج یافته اند. از مزایای این روش ها این است که حتی با تعداد کم انگل نیز آلودگی را نشان داده و گونه انگل را مشخص می سازند. لذا میتوان با استخراج DNA از لامهای رنگ آمیزی شده با گیمسا و انجام واکنش های زنجیره ای پلیمرازی (PCR) انگل را تعیین هویت نمود (۱۰،۱۱).

جهت مطالعات مولکولی قسمت های مختلف ژنوم انگل لیثمانیا استفاده می شود (۱۱،۱۲). یکی از قسمت های ژنوم که کاربرد زیادی دارد مربوط به ژن ریبوزوم (rDNA) می باشد که جهت تکثیر قطعه ITS1 (Internal Transcribed Spacer1) استفاده می گردد. در این روش به علت یکسان بودن طول محصول PCR قطعات ITS1 برای گونه های لیثمانیاهای بیماریزای انسانی لازم است با تعیین توالی و یا روش PCR-RFLP انگل تعیین هویت گردد (۱۳،۱۴). تعیین توالی هزینه بالایی دارد و مستلزم ارسال نمونه ها به مراکز علمی پیشرفته می باشد که حصول جواب چندین روز طول می کشد.

اما روش PCR-RFLP محدودیت های ذکر شده را ندارد. اساس کار این روش به این صورت است که مقداری از محصول PCR نمونه ها را با آنزیم های قطع کننده (هضم کننده) واکنش میدهند. از آنجایی که توالی نوکلئوتیدهای DNA در گونه های مختلف انگل لیثمانیا یکسان نیست لذا الگوی حاصل از هضم DNA توسط آنزیم های محدود کننده یکسان نبوده و منجر به پلی مورفیسم متمایز در حین الکتروفورز می گردد که برای هر گونه انگل لیثمانیا باند های خاصی مشاهده می گردد (۱۳،۱۵).

این مطالعه به منظور تعیین هویت انگل لیثمانیا با استفاده از تکنیک PCR-RFLP در لام های رنگ آمیزی شده مربوط به بیماران و جوندگان مخزن لیثمانیوز جلدی در شهرستان دامغان در سال ۱۳۸۷ صورت گرفته است.

روش کار:

این بررسی بر روی لام های رنگ آمیزی شده مربوط به زخم های انسانی و همچنین اسمیر های تهیه شده از جونده رومبومیس اپیموس که دارای انگل لیثمانیا بوده اند انجام گرفت. لام های انسانی از بیماران مشکوک به سالک که به مراکز بهداشتی درمانی مراجعه کرده بودند گرفته شد. جوندگان نیز از اطراف روستاهای آلوده صید شدند. لام ها پس از بررسی میکروسکوپی از نظر آلودگی به اجسام لیثمن، برای انجام آزمایشات مولکولی تحت فرایند استخراج DNA قرار گرفت. برای این کار از کیت مخصوص استخراج DNA از بافت (Bioneer, South Korea) استفاده شده است.

در این مطالعه تعداد ۲۵ نمونه انسانی و ۸ نمونه از جونده مورد آزمایش قرار گرفتند. برای تعیین هویت انگل از تکنیک Conventional PCR با برنامه حرارتی زیر استفاده شد (۱۳،۱۶).

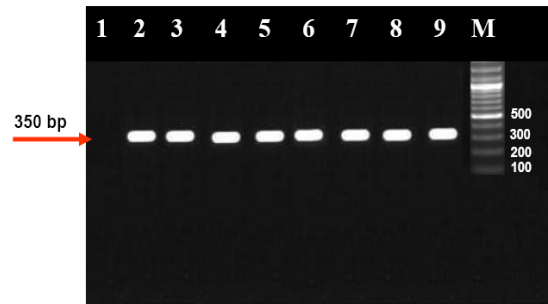
- 1) Preheating: 95°C-5 min
- 2) Denaturation: 94°C-30 s
- 3) Annealing: 48°C-30 s
- 4) Extension: 72°C-1 min
- 5) Final Extension: 72°C-7 min
- 6) Repeat 2 to 4 step: 35 cycles

پرایمر های بکار رفته در این مطالعه شامل LITSR (CTGGATCATTTTCCGATG) و L5.8S (TGATACCACTTATCGCACTT) بودند که قطعه ITS1 را در تمام گونه های لیثمانیا تکثیر می کنند (۱۳).

پس از انجام PCR، محصول بر روی ژل آگارز یک درصد

نتایج:

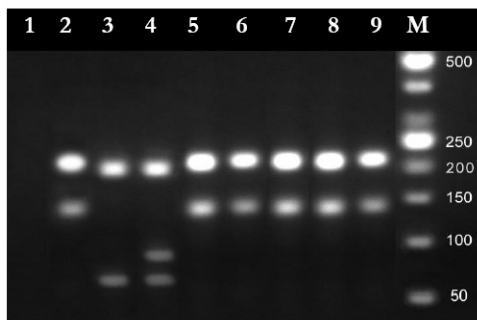
بررسی میکروسکوپی ۲۵ نمونه انسانی و ۸ نمونه از جونده رومبومیس اپیموس نشان داد که همگی دارای انگل لیثمانیا بوده اند. نمونه ها مورد آزمایش واکنش زنجیره ای پلیمرازی قرار گرفتند. پس از انجام الکتروفورز مشخص شد که باند های ایجاد شده در محدوده ۳۵۰ bp می باشند (تصویر ۱).



تصویر ۱: الکتروفورز محصول PCR ژن ITS1

ستون ۱: کنترل منفی؛ ستون ۲: لیثمانیا ماژور استاندارد (MHOM/IR/75/ER)؛ ستون ۳: لیثمانیا تروپیکا استاندارد (MHOM/IR/99)؛ ستون ۴: لیثمانیا اینفانتوم استاندارد (MCAN/IR/97/LON49)؛ ستون ۵-۷: نمونه های انسانی؛ ستون های ۸ و ۹: نمونه های جونده و M: نشانگر ۱۰۰ جفت بازی Fermentas

پس از واکنش RFLP و انجام الکتروفورز مشخص شد که باند های ایجاد شده در نمونه های انسانی و نمونه های جونده مشابه باندهای لیثمانیا ماژور استاندارد می باشند که به صورت دوباند ۲۲۰ bp و ۱۴۰ bp مشاهده شده اند در صورتیکه باند ایجاد شده برای نمونه های کنترل لیثمانیا تروپیکا و لیثمانیا اینفانتوم متفاوت با لیثمانیا ماژور بوده است (تصویر ۲).



تصویر ۲: الکتروفورز محصول PCR-RFLP ژن ITS1

ستون ۱: کنترل منفی؛ ستون ۲: لیثمانیا ماژور استاندارد (MHOM/IR/75/ER)؛ ستون ۳: لیثمانیا تروپیکا استاندارد (MHOM/IR/99)؛ ستون ۴: لیثمانیا اینفانتوم استاندارد (MCAN/IR/97/LON49)؛ ستون های ۵-۷: نمونه های انسانی؛ ستون های ۸ و ۹: نمونه های جونده و M: نشانگر ۵۰ جفت بازی Fermentas

حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز شد. سپس بر روی دستگاه ایلومیناتور از باندهای مشاهده شده عکس برداری شد. از آنجایی که با تکثیر ناحیه ITS1 باند ایجاد شده برای تمام گونه های انگل لیثمانیا بین ۳۰۰-۳۵۰ bp می باشد (۱۳، ۱۶، ۱۷) افتراق گونه ها غیرممکن خواهد بود لذا برای تعیین گونه انگل لیثمانیا از آنزیم محدودکننده HaeIII (معرفی شده توسط Dweik) جهت RFLP استفاده شد که توالی ITS1 را در قسمت GG↓CC قطع می کند و در انگلهای لیثمانیا با توجه به تعداد نقطه برش محللهای مختلفی قطع خواهند شد که پس از الکتروفورز، محصول به صورت باند های جداگانه بر روی ژل قابل رویت می باشد (۱۳).

برای انجام این واکنش به ازای هر ۲۵ μl از حجم واکنش، واکنشگرهای زیر با هم مخلوط شدند:

- ۱- محصول PCR تکثیر rDNA با کیفیت مناسب ۲۰ μl
- ۲- بافر مخصوص آنزیم ۲/۵ μl
- ۳- آنزیم محدودکننده HaeIII به میزان ۱ μl (معادل ۵ Unit)
- ۴- آب مقطر ۱/۵ μl

بعد از تهیه مخلوط اصلی آن را به مدت ۵ ثانیه با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ نموده و سپس ۱۰ μl روغن معدنی (Mineral Oil) جهت جلوگیری از تبخیر اجزای واکنش به آن اضافه شد. نمونه ها به مدت ۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت. بعد از اتمام واکنش ۱۰-۵ μl از محصول PCR-RFLP در کنار مارکر ژنتیکی ۵۰ bp (فرمتاز) در ژل ۲/۵٪ الکتروفورز گردید. در نهایت بعد از الکتروفورز از باندهای ایجاد شده عکس تهیه شد.

به منظور تعیین توالی نمونه ها، ۶۰ μl از محصول PCR دو نمونه انسانی و یک نمونه جونده مربوط به تکثیر ژن هدف آماده و با همکاری شرکت آرمین شگرف به شرکت SeqLab کشور آلمان ارسال گردید. این شرکت نتایج تعیین توالی نمونه ها را به صورت کروماتوگراف و توالی خطی ارائه نمود. جهت بررسی صحت توالی ها و تعیین هویت صحیح آنها از نرم افزار BLAST (www.ncbi.nih.gov/blast) استفاده شد.

جایگاه های برش آنزیم HaeIII بر روی توالی های بدست آمده و همچنین توالی نمونه های کنترل آزمایش شدند. این بررسی با استفاده از نرم افزار Nebcutter (<http://tools.neb.com/nebcutter>) انجام شد و در نقشه فیزیکی قطعه تعیین توالی شده محل برش آنزیمی روی مولکول DNA مشخص شد.

شهرستان دامغان بوده است که در این بررسی ابتدا برای کلیه نمونه های مطالعه و نمونه های استاندارد به منظور تکثیر ناحیه ITS1 واکنش های زنجیره ای پلیمرازی (PCR) انجام شد. پس از رویت باندهای ایجاد شده مشخص شد که برای نمونه های مطالعه حاضر و نمونه های استاندارد که از گونه های مختلفی بوده اند باندهایی در محدوده ۳۵۰ bp تشکیل شده است که جهت تعیین گونه کمکی نکرده است. لذا از روش RFLP جهت تمایز گونه ها استفاده شده است که نشان داد روش بسیار خوبی جهت تشخیص گونه های لیثمانیای ایجاد کننده بیماری در ایران است، به طوریکه با مشاهده پلی مورفیسم ایجاد شده در اثر هضم آنزیمی که برای هر گونه اختصاصی است می توان به نوع انگل پی برد. پس از الکتروفورز محصولات واکنش RFLP مشخص شد که باند های ایجاد شده برای نمونه های انسانی و جوندگی مشابه هم بوده و برای آنها دو باند در محدوده ۲۲۰ bp و ۱۴۰ bp مشاهده شده که مطابق با باند های ایجاد شده برای انگل لیثمانیا مازور استاندارد بوده است که می توان نتیجه گیری کرد که انگل لیثمانیا مازور در لام های رنگ آمیزی شده با گیمسا حضور داشته اند. به عبارتی افراد بیمار و جوندگی رومبومیس اپیموس به این انگل آلوده بوده اند. این انگل عامل لیثمانیوز جلدی نوع روستایی است و در بسیاری از کانونهای لیثمانیوز ایران انتشار دارد (۲۰، ۲۱، ۲۲).

هرچند که این روش در مطالعات دیگر تأیید شده است اما در این بررسی به منظور اطمینان بیشتر سه نمونه تعیین توالی شده اند که با نتایج روش RFLP همخوانی داشته است. روش PCR-RFLP می تواند روش بسیار مناسبی به منظور تعیین گونه باشد و با استفاده از این روش در وقت و هزینه صرفه جویی به عمل می آید به طوری که دیگر نیاز به مقدار زیاد محصول PCR و همچنین تعیین توالی نمی باشد.

مخزن بیماری در این مطالعه جوندگی رومبومیس اپیموس تشخیص داده شده است. این گونه در مناطق مرکزی و شمال شرقی ایران به عنوان مخزن اصلی بیماری لیثمانیوز جلدی روستایی معرفی شده است (۲۲، ۲۳). حضور جوندگی رومبومیس اپیموس با وفور نسبتاً بالا در فاصله بسیار نزدیک با روستاها و توسعه فعالیت های کشاورزی در منطقه به بومی شدن بیماری در منطقه کمک کرده است. لذا جهت کاهش بروز بیماری کنترل جوندگان همواره می بایست مد نظر قرار گیرد.

پس از تعیین توالی و تشخیص هویت نمونه ها با استفاده از نرم افزار BLAST مشخص شد که هر سه مورد از انگل های تعیین توالی شده مربوط به گونه انگل لیثمانیا مازور بوده است. توالی ژنی قطعه ITS1 انگل های جدا شده در بانک جهانی ژن ثبت شده اند که با شماره دسترسی GQ466350 مربوط به نمونه جوندگی و GQ466351-2 مربوط به نمونه های انسان قابل رویت می باشند.

بررسی جایگاه های برش آنزیم HaeIII بر روی توالی نمونه های این مطالعه و همچنین توالی نمونه های کنترل مثبت نشان داد که انگل لیثمانیا مازور دارای یک نقطه برش، لیثمانیا اینفانتوم دارای دو نقطه برش و لیثمانیا تروپیکا دارای سه نقطه برش می باشد. لذا باند های ۲۲۰ bp و ۱۴۰ bp برای لیثمانیا مازور و باندهای ۶۰ bp و ۸۰ bp برای لیثمانیا اینفانتوم قابل مشاهده هستند. با توجه به جایگاه های برش آنزیم بر روی توالی لیثمانیا تروپیکا انتظار باند های ۲۰، ۵۵، ۶۴، ۲۰۰ را خواهیم داشت اما به علت کوچک بودن قطعه ۲۰ bp و همپوشانی دو قطعه ۵۵ bp و ۶۴ bp که وزن مولکولی نزدیکی دارند فقط دو باند در محدوده ۲۰۰ bp و ۶۰ bp قابل رویت هستند. باندهای ایجاد شده برای هر سه گونه در تصویر شماره ۲ نشان داده شده است.

بحث:

شناسایی جنبه های اپیدمیولوژیک بیماری لیثمانیوز جلدی جهت ارائه برنامه کنترل ضرورت دارد. در این خصوص شناسایی انگل عامل بیماری اهمیت بالایی دارد چرا که مشخص کننده نوع بیماری در یک منطقه خواهد بود (۱۸). تشخیص دقیق گونه انگلهای لیثمانیا با مشاهده میکروسکوپی لام های رنگ آمیزی شده با گیمسا امکان پذیر نیست و برای تشخیص گونه نیاز به جداسازی انگل، کشت آن و تزریق به حیوان حساس آزمایشگاهی و یا استفاده از روش ایزوآنزیم می باشد که انجام آنها وقت گیر و پرهزینه بوده و مستلزم تکثیر انگل به تعداد زیاد می باشد (۱۹). روشهای متکی بر DNA از جمله PCR که جهت تشخیص بیماری لیثمانیوز در سالهای اخیر بسیار از آن استفاده می شود، محدودیت های فوق را نداشته و با مقدار کمی از DNA بافت آلوده می توان وجود آلودگی، گونه انگل و نوع بیماری را تشخیص داد (۱۹، ۱۱، ۱۰).

این مطالعه یک بررسی جهت تعیین هویت انگل لیثمانیا در انسان و جوندگان مخزن بیماری لیثمانیوز در

11. Alvar J, Baker JR. Molecular tools for epidemiological studies and diagnosis of leishmaniasis and selected other parasitic disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002;96(Suppl 1):S1-S250.
12. Banuls AL, Hide M, Prugnolle F. Leishmania and the leishmaniasis: A parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol* 2007; 64: 1-109
13. Dweik A, Schönian G, Mosleh IM, Karanis P. Evaluation of PCR-RFLP (based on ITS-1 and HaeIII) for the detection of eishmania species, using Greek canine isolates and Jordanian clinical material. *Ann Trop Med Parasitol* 2007; 101 (5):399-407.
14. El Tai NO, Osman OF, Fari M El, Presber W, Schonian G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of leishmania donovani spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000;94(5):575-79
15. Marfurt J, Neiederwieser I, Makia ND, Beck HP, Felger I. Diagnostic genotyping of old and new world leishmania species by PCR-RFLP. *Parasitology* 2003; 46: 115-124.
16. Kazemi-rad E, Mohebbali M, Hajarani H, Rezaei S, Mamishi S. Diagnosis and characterization of leishmania species in giemsa-stained slides by PCR-RFLP. *Iranian J Public Health* 2008;37(1): 54-60
17. Hajjarani H, Mohebbali M, Alimoradi S, Abai MR, Edrissian GH. Isolation and characterization of pathogenic leishmania turanica from neosokia indica (Rodentia, Muridae) by PCR-RFLP and ITS1 sequencing in Iran. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009;103(11):1177-9.
18. World Health Organization. Control of the leishmaniasis, technical, report.1990;18:793
19. Schonian G, Nasereddin A, Dinse N. PCR diagnosis and characterization of leishmania in local and imported clinical samples. *Diag Microbiol Infect Dis* 2003;47: 349-58.
20. Rassi Y, Javadian E, Amin M, Rafizadeh S, Vatandoost H, Motazedian H. Meriones libycus is the main reservoir of zoonotic cutaneous leishmaniasis in south of Islamic Republic of Iran. *East Mediterr Health J* 2006;12(3-4):474-7.
21. Rassi Y, Sofizadeh A, Abai MR, Oshaghi MA, Rafizadeh S, Mohebbali M, et al. Molecular detection of leishmania major in the vectors and reservoir hosts of cutaneous leishmaniasis in Kalaleh district, Golestan province, Iran. *Iranian J Arthropod-Borne Dis* 2008; 2(2) : 21-27.
22. Yaghoobi-Ershadi MR. [Study of current status of cutaneous leishmaniasis epidemiology in parts of Isfahan focuses for design and proposal control programme]. Medical entomology PhD Thesis. Health school, Tehran University of Medical Sciences, 1994. (Persian)

نتیجه نهایی:

تعیین هویت انگل لیشمانیا با استفاده از تکنیک PCR-RFLP در لام های رنگ آمیزی شده با گیمسا یک روش دقیق و مفیدی می باشد که می توان از آن در سایر کانون های لیشمانیوز کشور استفاده کرد. یکی از مزایای این روش این است که می توان گونه های ایجاد کننده بیماری در ایران را بدون انجام تعیین توالی تشخیص داد. در این روش نیازی به کشت انگل و یا تزریق به حیوانات حساس آزمایشگاهی نخواهد بود و می توان مستقیماً از روی لام رنگ آمیزی شده جهت تعیین هویت اقدام نمود.

سپاسگزاری:

این تحقیق در قالب پایان نامه دانشجویی کارشناسی ارشد رشته حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین و همچنین طرح تحقیقاتی مشترک بین دانشگاه علوم پزشکی تهران و سمنان با کد ۶۷۳۰ مورخ ۱۳۸۶/۱۰/۲۹ انجام شده است. در پایان از مسئولین و کارکنان دانشگاه علوم پزشکی تهران و مرکز بهداشت شهرستان دامغان قدردانی می گردد.

منابع:

1. Bates PA. Transmission of leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol* 2007; 37(10): 1097-1106.
2. Ardahali S, Rezaei H, Nadim A. [Leishmania and leishmaniasis]. 2nd ed. Tehran: Nashre Daneshgahi Center, 1994. (Persian)
3. Leishmaniasis. Report of the Scientific Working Group on Leishmaniasis, meeting report. 2-4 February 2004, Geneva, Switzerland. Available from: <http://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. Mohebbali M. [Zoonotic protozoa diseases]. Tehran: Nadi, 1996:60. (Persian)
6. Rassi Y, Hanafi bojd AA. [Sand fly, the vector of leishmaniasis]. Tehran: Noavaran Elm, 2006. (Persian)
7. 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.
8. Killick-Kendrick R. The biology and control of phlebotominae sand flies. *Med Vet Entomol* 1999; 17: 279-289.
9. Aransay AM, Scoulica E, Tselentis Y. Detection and identification of leishmania DNA within naturally infected sand fleas by semi-nested PCR on minicircle kinetoplast DNA. *Appl Environ Microbiol* 2000;66(5):1933-38
10. Singh S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian J Med Res* 2006;123:311-30.