فصلنامه دانش و تندرستی، دوره ۵، شماره ۲ و ۳، تابستان و پاییز ۱۳۸۹
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود

مقاله پژوهشی

جداسازی انگل لیشمانیا تورانیکا از فلبوتوموس پاپاتاسی به‌وسیله تعیین توالی ناحیه (Internal Transcribed Spacer 1) ITS1 در کانون لیشمانیوز جلدی روستایی شهرستان دامغان، استان سمنان

صادق محمدی ازنی[۱] (M.Sc.)، یاور رائی[۲*] (Ph.D.)، محمدعلی عشاقی[۳] (Ph.D.)، محمدرضا یعقوبی ارشادی[۴] (Ph.D.)، مهدی محبعلی[۲] (Ph.D.)، محمدرضا عبایی[۵] (M.Sc.)، فاطمه محترمی[۵] (M.Sc.)، زینب نوکنده[۶] (B.Sc.)، سینا رفیع‌زاده[۷] (B.Sc.)

۱- دانشگاه علوم پزشکی سمنان- مرکز بهداشت شهرستان دامغان- کارشناس ارشد حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین. ۲- دانشگاه علوم پزشکی تهران- گروه حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین- استاد. ۳- دانشگاه علوم پزشکی تهران- گروه حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین- دانشیار. ۴- دانشگاه علوم پزشکی تهران- گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی پزشکی- استاد. ۵- دانشگاه علوم پزشکی تهران- گروه حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین- مربی. ۶- دانشگاه علوم پزشکی سمنان- مرکز بهداشت شهرستان دامغان- کارشناس میکروبیولوژی. ۷- وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی- کارشناس اداره سوانح و حوادث.

تاریخ دریافت:۱۳۸۸/۱۰/۱۲، **تاریخ پذیرش:**۱۳۸۹/۵/۱۲

چکیده

مقدمه: *انگل لیشمانیا تورانیکا نیز از فلبوتوموس پاپاتاسی و جوندگان جدا شده که بیماری‌زایی آن در انسان مشخص نیست.*

مواد و روش‌ها: *این مطالعه به‌منظور تعیین آلودگی پشه خاکی‌ها به انگل لیشمانیا تورانیکا در مناطق روستایی شهرستان دامغان انجام شده است. در این مطالعه پشه خاکی‌ها به‌وسیله تله‌های چسبان صید شده‌اند. پشه خاکی‌های ماده پس از شناسایی در فرایند استخراج DNA و جستجو برای انگل لیشمانیا در تکنیک Conventional PCR با استفاده از پرایمرهای ITS1 (LITSR و L5.8S) قرار گرفتند. محصولات واکنش تعیین توالی توسط نرم‌افزار Blast تجزیه و تحلیل شدند.*

نتایج: *۲۱۸ پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی مورد آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی قرار گرفتند. یک مورد از انگل‌های جداشده مربوط به گونه لیشمانیا تورانیکا بوده است (۰/۵٪). این یافته نخستین بار در استان سمنان و دومین مرتبه در ایران ثبت شده است.*

نتیجه‌گیری: *بیماری‌زایی لیشمانیا تورانیکا در انسان مشخص نیست اما در موش‌های آزمایشگاهی باعث بیماری می‌شود. مطالعات نشان می‌دهند در آلودگی همزمان جوندگان به انگل‌های لیشمانیا تورانیکا و ماژور، قدرت بیماری‌زایی لیشمانیا ماژور افزایش می‌یابد. این نشان می‌دهد شاید ایمنی برخی افراد به لیشمانیوز جلدی در مناطق آندمیک به‌علت مواجهه با لیشمانیا تورانیکا باشد و این گونه می‌تواند به‌عنوان کاندیدی جهت ساخت واکسن مدنظر قرار گیرد.*

واژه‌های کلیدی: فلبوتوموس پاپاتاسی، لیشمانیا تورانیکا، ITS1، دامغان.

Original Article **Knowledge & Health 2010;5(2,3):48-51**

Isolation of Leishmania Turanica from Phlebotomus Papatasi Using ITS1 Sequencing at Zoonotic Cutaneous Leishmanianisis Focus in Damghan, Semnan Province

Sadegh Mohammadi-Azni [1],Yavar Rassi[2*], Mohammad-Ali Oshaghi[2], Mohammad-Reza Yaghoobi Ershadi[3], Mehdi Mohebali[2], Mohammad-Reza Abai[2], Fatemeh Mohtarami[2], Zeinab Nokandeh[1], Sina Rafie-Zadeh[4]

1- Damghan Health Center, Semnan University of Medical Sciences, Damghan, Iran. 2- Dept. of Medical Entomology and Vector Control, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. 3- Dept. of Medical Parasitology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. 4- Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran.

Abstract:

Introduction: *L.turanica is isolated from Phlebotomus Papatasi and rodents, and its pathogenetic role in humans is not clear yet.*
Methods: *This study aimed at determining the infection of sand flies to L.turanica in rural parts of Damghan. Sand flies were collected by sticky papers. After the identification of female specimens, their DNA was extracted and Conventional PCR technique using specific primers of ITS1 was used to search for L.turanica. Products of PCR were sequenced and analyzed with Blast software.*
Results: *Two hundred and eighteen specimens of female P.papatasi were examined for Leishmania infection. One out of 218 females (0.5%) was positive to L.turanica. This is the first report of natural infection of P.papatasi due L.turanica in Semnan Province and the second in Iran.*
Conclusion: *Pathogenesis of L.turanica is not clear on human, but, this parasite is pathogenic in laboratory mice. Furthermore, mix synchronized infection of rodents to L.major and L.turanica aggravates pathogenetic effect of L.major. Immunity of some people to Cutaneous Leishmanianisis in endemic areas can be due to the exposure to L.turanica and this can be a suitable candidate for vaccine investigations against cutaneous leishmaniasis.*

Keywords: Phlebotomus papatasi, Leishmania turanica, ITS1, Damghan.

Received: 2 January 2010 Accepted: 3 August 2010

***Corresponding author:** Y. Rasi**, Email:** rassiy@sina.tums.ac.ir*

نویسنده مسوول: تهران- دانشگاه علوم پزشکی تهران- دانشکده بهداشت- استاد و مدیر گروه حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، **تلفن:** ۸۸۹۵۱۳۹۳-۰۲۱،
E-mail: rassiy@sina.tums.ac.ir

مقدمه

لیشمانیوز جلدی یکی از بیماری‌های انگلی می‌باشد که در بیش از ۸۸ کشور دنیا دیده می‌شود. از لحاظ تظاهرات بالینی و خصوصیات اپیدمیولوژیک، بیماری لیشمانیوز جلدی به دو شکل خشک (شهری) و مرطوب (روستایی) تقسیم می‌شود. ضایعات سالک معمولاً در نقاط باز بدن و جاهایی که بیش‌تر در معرض گزش پشه‌خاکی هستند به‌وجود می‌آیند. در نوع شهری ضایعات غالباً در صورت و در نوع روستایی بیش تر بر روی دست و پا ظاهر می‌شوند (۱، ۲ و ۳).

ایران نیز یکی از کشورهایی می‌باشد که بیماری در آن به‌صورت بومی وجود دارد، به‌طوری‌که بیش از ۱۵ استان درگیر با این معضل بهداشتی می‌باشند.

در کانون‌های لیشمانیوز جلدی روستایی (Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis) مناطق مختلف ایران، ناقل بیماری به انسان پشه خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی می‌باشد که انگل لیشمانیا ماژور را از جوندگانی همچون رومبومیس اپیموس، تاترا ایندیکا، مریونس هوریانه، نزوکیا ایندیکا، مریونس لیبیکوس که مخزن بیماری هستند گرفته و به میزبانان دیگر از جمله انسان انتقال می‌دهد (۱، ۲، ۳، ۴ و ۵).

شناسایی ناقلین بیماری برای مشخص کردن سیکل زندگی انگل و هم-چنین شناخت بهتر اپیدمیولوژی بیماری اهمیت به‌سزایی دارد. در مناطق مختلف کشور به‌منظور تعیین هویت انگل‌های جدا شده از پشه‌خاکی‌ها مطالعات مختلفی انجام شده است. در کانون‌های لیشمانیوز جلدی نوع روستایی انگل لیشمانیا ماژور از گونه‌های مختلف پشه‌خاکی‌ها تعیین هویت شده است (۶، ۷ و ۸). اما انگل لیشمانیا تورانیکا برای اولین بار توسط پرویزی و همکاران در سال ۲۰۰۸ در فلبوتوموس پاپاتاسی گزارش گردید (۹). در همان سال این انگل برای اولین بار از جونده نزوکیا ایندیکا نیز گزارش شده است (۱۰). برخی مطالعات نشان می-دهند که انگل لیشمانیا تورانیکا برای انسان پاتوژن نیست اما در جوندگان میانگین دوره آلودگی را افزایش می‌دهد. بدین صورت که آلودگی هم‌زمان این انگل با لیشمانیا ماژور در جوندگان باعث افزایش قدرت بیماری‌زایی انگل لیشمانیا ماژور شده است (۱۱ و ۱۲). تحقیقات دیگر نشان می‌دهد انگل لیشمانیا تورانیکا در موش‌های BALB/c و هامستر طلایی پاتوژن، بوده باعث ایجاد بیماری در آن‌ها می‌شود (۱۰ و ۱۲). این احتمال وجود دارد که شاید ایمنی برخی افراد نسبت به لیشمانیوز جلدی در مناطق بومی به علت مواجهه با انگل لیشمانیا تورانیکا باشد و این گونه می‌تواند به‌عنوان کاندیدی جهت ساخت واکسن مد نظر قرار گیرد.

این مطالعه به‌منظور بررسی آلودگی پشه‌خاکی به گونه انگل لیشمانیا تورانیکا در مناطق روستایی شهرستان دامغان در سال ۱۳۸۷ انجام شد.

برای تعیین هویت انگل لیشمانیا از تکنیک Conventional PCR و از پرایمرهای اختصاصی(Internal Transcribed Spacer 1) ITS1 استفاده شده است (۱۳). این پژوهش اولین تحقیق جهت تعیین آلودگی پشه خاکی‌ها به این روش در استان سمنان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این بررسی سه روستای حسن‌آباد، فرات و امرزان به‌عنوان روستاهای ثابت نمونه‌گیری و روستاهای قاسم‌آباد، سلطانیه، درروار، آستانه و مناطق کارگری کوره‌های آجرپزی به‌عنوان روستاهای متغیر نمونه‌برداری انتخاب گردیدند. جهت صید پشه‌خاکی‌ها هر ۱۵ روز یک بار از هر یک از روستاهای ثابت (حسن‌آباد، فرات و امرزان) سه خانه انتخاب می‌شد. اماکن مسکونی طوری انتخاب شدند که یکی در حاشیه روستا، یکی در مرکز روستا و دیگری در حد فاصل دو خانه فوق باشد. هم‌چنین سعی شد تا خانه‌هایی انتخاب شوند که دام در واحد مسکونی نگهداری می-کنند. نمونه‌برداری در ۱۵ نوبت طی ماه‌های فروردین، اردیبهشت، خرداد، تیر، مرداد، شهریور، مهر و آبان با نصب ۹۰ تله چسبان در اماکن داخلی (مکان‌های دارای سقف) و ۹۰ تله درمحیط‌های خارجی (محل-های فاقد سقف) و ۳۰ تله در لانه‌های جوندگان، انجام شد. تله‌های چسبان تهیه شده یک ساعت قبل از غروب آفتاب در اماکن داخلی (انسانی و حیوانی)، اماکن خارجی و لانه‌های جوندگان نصب و صبح روز بعد، قبل از طلوع آفتاب جمع‌آوری می‌شد. پشه‌خاکی‌های صید شده را به آزمایشگاه منتقل کرده، سر و انتهای بدن هر پشه خاکی قطع و روی لام مونته می‌شدند تا با استفاده از کلید معتبر، تعیین گونه گردند (۱۴). باقی‌مانده پشه‌خاکی که شامل سینه و قسمت اعظم شکم بود، به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری حاوی اتانول ۹۶ درجه منتقل شده و برای استخراج DNA آماده می‌گردید. به لام‌های تهیه شده و میکروتیوب‌ها بر چسب مشابه اختصاص داده می‌شد. استخراج DNA فقط از قسمت سینه و شکم پشه‌خاکی که جدا شده بودند انجام گرفت. لام‌های میکروسکوپی فقط برای تعیین هویت و تشخیص گونه پشه-خاکی تهیه شدند و در استخراج DNA استفاده نشده‌اند.

برای استخراج DNA از کیت استخراج DNA از بافت (Bioneer;South Korea) استفاده شده است. در این تحقیق برای تعیین هویت انگل از تکنیک Conventional PCR با برنامه حرارتی زیر استفاده شد.

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

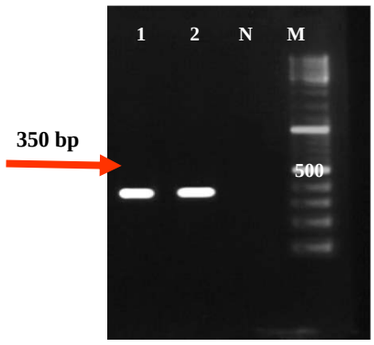
پرایمرهای به‌کار رفته در این مطالعه شامل LITSR (CTGGATCATTTTCCGATG) و L5.8S (TGATACCACTTATCGCACTT) بودند که قطعه ITS1 را در تمام گونه‌های لیشمانیا تکثیر می‌کند (۱۳، ۱۵ و ۱۶).

پس از انجام PCR، محصول بر روی ژل آگارز یک درصد حاوی اتیدیوم بروماید، الکتروفورز شدند. سپس بر روی دستگاه ایلومیناتور گذاشته و در صورت مشاهده باندهای DNA، از آن عکسبرداری می‌شد. باند ایجاد شده برای تمام گونه‌های انگل لیشمانیا بین ۳۵۰bp–۳۰۰ می‌باشد. از آن‌جایی که با تکثیر ناحیه ITS1 باند ایجاد شده برای تمام گونه‌های انگل لیشمانیا بین ۳۵۰bp–۳۰۰ می‌باشد، افتراق گونه‌ها غیر ممکن خواهد بود. بنابراین محصولات PCR نمونه‌هایی که ژن ITS آن‌ها مثبت شده‌اند را تعیین توالی نمودیم. با توجه به این‌که این عملیات هزینه بالایی دارد تنها به تعیین توالی سه نمونه اکتفا شده است. به‌منظور تعیین توالی نمونه‌ها، ۶۰µl از محصول PCR با کیفیت مناسب مربوط به تکثیر ژن هدف آماده و با همکاری شرکت آرمین شگرف به شرکت Seqlab کشور آلمان ارسال گردید. همراه نمونه‌ها فرم مخصوص سفارش و مقداری پرایمر ارسال گردید. شرکت Seqlab نتایج سکوئنس نمونه‌ها را به‌صورت کروماتوگراف و توالی خطی ارایه نمود. جهت بررسی صحت توالی‌ها و تعیین هویت صحیح آن‌ها از نرم‌افزار BLAST (www.ncbi.nih.gov.org/blast) استفاده شد. به منظور مقایسه توالی‌های نمونه‌های حاصل از مطالعه ما با توالی‌های موجود در Genbank از نرم‌افزار ClustalW استفاده شده و درصد مشابهت و اختلاف بین نمونه ما و نمونه موجود در بانک جهانی ژن به‌دست آمد.

نتایج

در این تحقیق تعداد ۲۱۸ پشه‌خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی مورد آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی قرار گرفتند. پس از انجام الکتروفورز مشخص شد که باندهای ایجاد شده در محدوده ۳۵۰bp می‌باشد (شکل ۱).

پس از تعیین توالی و تشخیص هویت نمونه با استفاده از نرم‌افزار BLAST مشخص شد که یک مورد از انگل‌های جدا شده و تعیین هویت شده مربوط به گونه انگل بوده است (۰/۵٪ کل نمونه‌ها). توالی ژنی انگل جداشده در بانک جهانی ژن ثبت شده است که با شماره دسترسی GQ466355 قابل مشاهده می‌باشد. هم‌چنین نرم‌افزار ClustalW نشان داد نمونه حاصل از این مطالعه با نمونه‌های دیگر لیشمانیا تورانیکا یافت شده در آسیای مرکزی و ایران (با شماره دسترسی EF413079)، مغولستان (با شماره‌های دسترسی AJ000307-9 و AJ272380)، ازبکستان (با شماره دسترسی AJ272378)، ترکمنستان (با شماره‌های دسترسی AJ272379 و



تصویر ۱- الکتروفورز محصول PCR ژن ITS1 انگل لیشمانیا: شماره ۱ مربوط به انگل لیشمانیا تورانیکا bp ۳۵۰، شماره ۲ کنترل مثبت،N کنترل منفی و M سایز مارکر bp ۱۰۰(سیناژن: ایران)

AJ272381) و نمونه قزاقستان (شماره دسترسی AJ272382) کاملا مشابه می‌باشد.

بحث

در این مطالعه، روش PCR با استفاده از تعیین توالی ناحیه ITS1 انگل‌های لیشمانیا در فلبوتوموس پاپاتاسی برای اولین بار در استان سمنان به‌کار رفته است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد استفاده از این روش در مقایسه با سایر روش‌ها ازجمله تشریح پشه‌خاکی‌ها، تزریق به حیوان حساس و ایزوآنزیم‌ها، بسیار سریع و حساس می‌باشد و با این روش می‌توان به‌طور مستقیم عامل بیماری را در بدن پشه‌خاکی‌ها تعیین هویت نمود. چون تشریح تک‌تک پشه‌ها بسیار وقت‌گیر بوده و نیازمند تجربه و مهارت بالا می‌باشد، ضمن این‌که نیازمند تکنیک‌های تکمیلی دیگر برای تعیین گونه می‌باشد. روش ایزوآنزیم به‌منظور تعیین گونه، علی‌رغم دقت بیش‌تر آن نسبت به روش‌های مولکولی دارای معایبی می‌باشد که از آن جمله می‌توان نیازمندی به کشت تعداد زیاد انگل را نام برد (۱۷). فلبوتوموس پاپاتاسی ناقل اصلی لیشمانیوز جلدی نوع روستایی در کشور ما بوده و در انتقال انگل لیشمانیا ماژور در بین جوندگان و هم‌چنین به انسان نقش دارد (۶، ۷ و ۱۴). در این تحقیق علاوه بر این انگل، انگل لیشمانیا تورانیکا نیز از پشه‌خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی مناطق روستایی شهرستان جدا شده است که این مهم برای اولین بار در استان سمنان و دومین بار در کشور ایران رخ داده است. نقش اپیدمیولوژیک انگل لیشمانیا تورانیکا در چرخه انتقال بیماری مشخص نیست. در مطالعه‌ی پرویزی برای اولین بار این آلودگی را گزارش داد (۹).

آلودگی به انگل لیشمانیا تورانیکا در جوندگان نیز گزارش شده است. به‌طوری‌که محققان توانستند آن را از رومبومیس اپیموس و نزوکیا ایندیکا جدا سازند (۱۰ و ۱۸). مطالعات نشان می‌دهند آلودگی همزمان جوندگان

به انگل‌های لیشمانیا ماژور و تورانیکا باعث ایجاد عفونت‌های دراز مدت در آن‌ها شود و تا پایان عمر در بدن جونده باقی می‌ماند (۱۱ و ۱۲).
بیماری‌زایی انگل لیشمانیا تورانیکا برای انسان مشخص نیست و در زمینه تأثیر آن بر سیستم ایمنی انسان تا به‌حال مطالعه‌ای صورت نگرفته است. اما در حیوانات آزمایشگاهی نظیر هامستر طلایی و موش-های BALB/c باعث ایجاد بیماری شده و هم‌چنین بر روی سیستم ایمنی جوندگان مخزن نیز تأثیرگذار است (۱۰، ۱۱ و ۱۲). از آن‌جایی‌که در نتایج مطالعه پرویزی (۹) و تحقیق حاضر آلودگی به این انگل در پشه‌خاکی فلبوتوموس پاپاتاسی نیز به اثبات رسیده، بنابراین می‌توانند از طریق گزش پشه به انسان منتقل شوند. در اینجا این سوال پیش می‌آید که آیا مواجهه با انگل لیشمانیا تورانیکا می‌تواند در انسان بر علیه لیشمانیا ماژور ایمنی ایجاد کند یا خیر؟ برخی از افراد در مناطق بومی بدون سابقه ابتلا به بیماری و مواجهه با لیشمانیا ماژور در مقابل بیماری لیشمانیوز جلدی نوع روستایی مقاوم هستند. بنابراین پیشنهاد می‌شود گونه انگل لیشمانیا تورانیکا در مطالعات ساخت واکسن مدنظر قرار گیرد. همانطور که آلودگی هم‌زمان جوندگان به انگل‌های لیشمانیا ماژور و تورانیکا منجر به افزایش بیماری‌زایی انگل لیشمانیا ماژور شده و در نتیجه باعث طولانی شدن دوره بیماری می‌شود، شاید یکی از علل زخم‌های بسیار بزرگ و دیر التیام یابنده در انسان نیز حضور هم‌زمان دو انگل باشد که جهت تأیید این مورد تعیین هویت انگل در زخم‌های انسانی توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب پایان‌نامه 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 انجام شده است. بدین‌وسیله نهایت تشکر خود را از مسوولین و کارکنان دانشگاه علوم پزشکی تهران و مرکز بهداشت شهرستان دامغان ابراز می‌داریم.

References

1. Ardahali S, Rezaei H, Nadim A. Leishmania and Leishmaniasis. 2nd ed.Tehran: Tehran Uneversity Publication Center;1994.[Persian].
2. Nilforushzadeh MA, Sadeghian G. Cutaneous Leishmaniasis. 1st ed. Tehran: Oruj publication;2002.[Persian].
3. Yazdankhah A, Tabasi N, Mohebali M. Controlling the rural cutaneous leishmaniasis in maraveh tappeh district, golestan province. Hakim Researched Journal 1999;1:43-50.[Persian].
4. Hamzavi Y, Mohebali M, Edrisian GH, Foruzani A. Epidemiological study of cutaneous leishmaniasis (human infection and animal reservoir) in dashti and dashestan phlebotomus papatasi from isfahan province, iran: comparison district, booshehr province. Journal of Iranian J Publ Hlth 2000;1-4:179-190.[Persian].
5. Ezeddin S. Study of cutaneous leishmaniasis in rural area of Shahroud district, Semnan Province, MSc thesis. Tehran:UMS;1994.[Persian].
6. Abai MA, Rassi Y, Imamian H, Fateh M, Mohebali M, Rafizadeh S, et al. PCR based on identification of vectors of zoonotic cutaneous Leishmaniasis in Shahrood District, Central of Iran. Pakistan Journal of Biol Sci 2007;10(12):2061-2065.
7. Rassi Y, Ghasemi MM, Javadian E, Motazedian H, Rafizadeh S, Aghaei Afshar A, et al. Determine of reservoirs & vectors of cutaneous Leishmaniasis by Nested-PCR in villages of Marvdasht district, Fars province. Scientific Journal of Kerman University of Medical Sciences and Health Services 2006;14(2):134-139.[Persian].
8. Yaghoobi Ershdi MR, Javadian E, TahvildareBidruni GH. Leishmania major MON-26 isolated from naturally infected phlebotomus papatasi (Dip:Psychodidae) in Isfahan province, Iran. Acta Tropica 1995;59:279-82.[Persian].
9. Parvizi P, Ready PD. Nested PCRs and sequencing of nuclear ITS-rDNA fragments detect three Leishmania species of gerbils in sandflies from Iranian foci of zoonotic cutaneous leishmaniasis. Tropical Medicine & International Health 2008;13(9):1159-1171.
10. Hajaran H, Mohebali M, Alimoradi S, Abai MR, Edrissian GH H. Isolation and characterization of pathogenic Leishmania turanica from Nesokia indica (Rodentia, Muridae) by PCR-RFLP and ITS1 sequencing in Iran. Trans R Soc Trop Med Hyg 2008;990.
11. Strelkova MV, Pacheco RS, Bulat SA, Rakitskaya TA. Comparison of some molecular-genetic techniques for identificationof Leishmania circulating in natural foci of zoonotic cutaneousleishmaniasis in the Central Asia region. Mem Inst Oswaldo Cruz1997;92:109-14.
12. Guan LR, Yang YQ, Qu JQ, Shen WX. Discovery and study of Leishmania turanica for the first time in China. Bull World Health Organ 1995;73:667-72.
13. Schonian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, et al. PCR diagnosis and characterization of Leishmania in local and imported clinical samples. Diagn Microbiol Infect Dis 2003;47(1):349-58.
14. Seyedi-Rashti MA, Nadim A. The genus phlebotomus (Dip: Psychodidae, phlebotominae) of the countries of the Eastern Mediterranean region. Iranian Journal of Public Health 1992;21:11-50.[Persian].
15. El Tai N0, Osman 0F, Fari M El, Presber W, Schonian G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of Leishmania cfonovani spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. Trans R Soc Trop Med Hyg 2000;94(5):575-79.
16. Kazemi-Rad E, Mohebali M, Hajaran H, Rezaei S, Mamishi S. Diagnosis and characterization of leishmania species in giemsa-stained slides by PCR-RFLP. Iranian Journal of Public Health 2008;37(1):54-60.
17. Parvizi P, Mauricio I, Aransay AM, Miles MA, Ready PD. First detection of Leishmania major in peridomestic Phlebotomus papatasi from Isfahan province, Iran: comparison of nested-PCR of nuclear ITS ribosomal DNA and semi-nested PCR of minicircle kinetoplast DNA. Acta Tropica 2005;93(1):75-83.
18. Mohebali M, Javadian E, Yaghoobi-Ershadi MR, Akhavan AA, HajjaranH, Abaei MR. Characterization of Leishmania infection in rodents from endemic areas of the I.R. of Iran. East Mediterr Health J 2004;10:591-9.