مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان / بهار ۱۳۸۷ / دوره ۱۰ / شماره ۱ (پی‌درپی ۲۵) / صفحات ۶۱ تا ۶۶

تحقیقی

شناسایی گونه و زیرگونه‌های انگل‌های لیشمانیای جدا شده از انسان، مخازن حیوانی و ناقلین براساس پلی‌مرفیسم آنزیمی درشمال غرب ایران

دکتر عبدالصمد مظلومی گاوگانی*[۱]، دکتر محمد حسن حجتی[۲]، اردوان قازانچائی[۳]، دکتر حسن محیط[۴]، دکتر حشمت الله طاهرخانی[۵]، دکتر کلایو دیویس[۶]

۱- دانشیار گروه انگل‌شناسی، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز. ۲- دانشیار گروه انگل‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی تبریز.

۳- فوق‌لیسانس انگل‌شناسی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی تبریز.

۴- دامپزشک و همطراز هیأت علمی گروه انگل‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی تبریز. ۵- دانشیار گروه انگل‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی گرگان.

۶- استاد حشره‌شناسی واحد بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشکده طب گرمسیری و بهداشت، دانشگاه لندن.

چکیده

زمینه و هدف : *علی‌رغم گستره جغرافیایی وسیع در منطقه مدیترانه، لیشمانیا اینفانتوم زایمودم (MON1≅LON-49) به عنوان زیمودم غالب در ایجاد بیماری کالاآزار شناخته شده است. هرگونه و استرین از گروه لیشمانیا انتشار جغرافیایی خاص داشته و تمایل به ایجاد بیماری منحصر به فرد با روش درمان متفاوتی دارد. این مطالعه به منظور شناسایی گونه و زیرگونه‌های انگل‌های لیشمانیای جدا شده از انسان، مخازن حیوانی و ناقلین براساس پلی‌مرفیسم آنزیمی درشمال غرب ایران انجام شد.*

روش بررسی: *در این مطالعه توصیفی نمونه‌ها از ۱۲ آسپیره مغز استخوان بیماران مبتلا لیشمانیازیس، ۲۶ آسپیره طحال و کبد سگ و بیش از ۱۰۰ پشه خاکی در طی سال‌های ۸۶-۱۳۸۴ از منطقه شمال غرب ایران به دست آمدند. پس از کشت نمونه‌ها در محیط NNN و α MEM ، مقایسه با گونه‌های مرجع WHO، لیشمانیا (لیشمانیا) دونووانی (DD8) ، لیشمانیا (لیشمانیا) اینفانتوم (IPT-1) ، لیشمانیا (لیشمانیا) تروپیکا (K-27) و لیشمانیا (لیشمانیا) ماژور(5-ASKH) ، با استفاده از الکتروفورز در Starch Gel انجام شد. آنزیم‌های مطالعه شده PKوPEPD،PGM ،6PGD،MDH،GPI،MPI،NH،ES،SOD،ASAT،ALAT بودند.*

یافته‌ها : *در این مطالعه تنها زایمودم به دست آمده در تمام نمونه‌های سگی و انسانی و پشه‌خاکی‌ها زایمودم MON1≅LON-49 بود که متعلق به گونه لیشمانیا (لیشمانیا) اینفانتوم است.*

نتیجه‌گیری: *این مطالعه نشان داد که لیشمانیوز احشایی در شمال غرب ایران از نوع مدیترانه‌ای است که از پرتغال و مراکش، تا پاکستان در شرق و جمهوری‌های آسیای مرکزی توسعه پیدا کرده است و نیز سگ‌های اهلی به عنوان مخازن اصلی انگل لیشمانیوز احشایی از گونه لیشمانیا اینفانتوم (زایمودم MON1) محسوب می‌شوند.*

کلید واژه‌ها: *لیشمانیا اینفانتوم ، ایزوآنزیم الکتروفورز ، ایران*

---

* *نویسنده مسؤول : دکتر عبدالصمد مظلومی گاوگانی ، پست الکترونیکی : mazloumi@tbzmed.ac.ir*

نشانی : تبریز ، دانشگاه علوم پزشکی تبریز ، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی ، بخش انگل شناسی ، تلفن : ۳۳۶۳۲۳۴-۰۴۱۱ (داخلی ۲۳۹) ، نمابر : ۳۳۶۳۲۳۱

وصول مقاله : ۸۶/۵/۲۳ ، اصلاح نهایی : ۸۶/۱۱/۲۳ ، پذیرش مقاله : ۸۶/۱۲/۲۶

مقدمه

جنس لیشمانیا شامل ۳۰ گونه بوده و گونه‌ای که شایع‌تر است و عامل اشکال مختلف بیماری محسوب می‌شود، لیشمانیا (لیشمانیا) اینفانتوم است که عامل اتیولوژیک لیشمانیای احشایی زئونوتیک است (۱). هر عضوی از گروه لیشمانیاها، انتشار جغرافیایی خاص و تمایل به ایجاد بیماری منحصر به فرد دارند (۲).

لشمانیوز احشایی زئونوتیک در ایران به طور تک‌گیر (اسپورادیک) در تمام نقاط ایران وجود داشته است، اما مناطق آندمیک مشخصی نیز مانند کلیبر، اهر در شمال غرب ایران (آذربایجان شرقی) وجود دارند (۳). در نواحی آندمیک بیش از ۵۰ درصد از کل بیماران لیشمانیوز احشایی را کودکان زیر ۲سال و ۹۰ درصد این افراد را کودکان زیر ۱۲ سال تشکیل می‌دهند (۴). شناسائی گونه‌های مختلف لیشمانیا با استفاده از روش‌های تاکسونومیک ژنتیک مثل آنالیز DNA کینتوپلاست، الگوهای ایزوآنزیم و آزمون‌های سرولوژیک منجر به تغییراتی در تقسیم‌بندی شده است (۲و۵). امروزه روش ایزوآنزیم الکتروفورزیس به عنوان برترین روش استاندارد محسوب می‌شود (۵و۶). ایزوآنزیم‌ها از جنس پروتئین بوده و از نظر ساختمانی یکسان می‌باشند. پروفایل به مجموعه‌ای از این ایزوآنزیم‌ها گفته می‌شود و جمعیتی از انگل‌های یک گونه که با سایرین در حرکت تعدادی از آنزیم‌های اختصاصی در الکتروفورز تفاوت داشته باشند، زایمودم نامیده می‌شوند (۷). گونه شایع در کانون مدیترانه‌ای لشمانیوز احشایی لیشمانیا اینفانتوم (MON≅LON-49) با زایمودم (MHOM/TN/80/IPTI) می‌باشد (۸). این مطالعه به منظور شناسایی اختصاصی گونه‌های لیشمانیا در بیماران کالاآزار و تعیین مخازن طبیعی و ناقلین این انگل در کانون آندمیک شمال غرب کشور انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی نمونه‌ها از ۱۲ آسپیره مغز استخوان بیماران مبتلا لیشمانیازیس، ۲۶ آسپیره طحال و کبد سگ و بیش از ۱۰۰ پشه خاکی در طی سال‌های ۸۶-۱۳۸۴ از منطقه شمال غرب ایران (شهرهای اهر، کلیبر و آذرشهر) به دست آمدند. بیماران مبتلا به لیشمانیوز احشایی با روش‌های بالینی و سرولوژیکی تشخیص داده شده بود و در طیف سنی متفاوت (۳ نفر زیر یک‌سال، ۷ نفر ۲-۵ سال و ۲نفر بالاتر از ۲۰ سال) قرار داشتند. بیماران بومی و ساکن منطقه شمال غرب (۳نفر از کلیبر، ۶ نفر از اهر و ۳ نفر از اطراف تبریز) بودند. آسپیراسیون به وسیله متخصص انجام گردید و نمونه‌ها برای تایید عفونت با رنگ‌آمیزی گیمسا آزمایش شدند و هم‌زمان در محیط‌های کشت NNN و MEM کشت داده شدند. بیماران در بیمارستان‌های مربوط با مگلومین آنتی‌مونات تحت درمان قرار گرفتند.

جداسازی ارگانیسم‌ها از سگ‌ها و پشه‌خاکی

بعد از اخذ مجوز رسمی برای شکار و نمونه‌برداری از سگ‌های ولگرد بیمار علامت‌دار با همکاری بخش بهداشت محیط اهر و کلیبر انجام شد. ۱۰ قلاده سگ با سم استریکنین و بقیه با اسلحه شکار شدند. از سگ‌های صاحب‌دار بعد از تست و تایید بیماری نمونه‌برداری به عمل آمد. مواد بیولوژیکی از کبد و طحال سگ‌های کشته شده آسپیره گردید و در مجموع ۲۶ ایزوله از سگ‌ها (از کلیبر ۱۵ و از اهر ۱۱ مورد) به دست آمد. پشه‌خاکی‌ها از روستاهای مناطق آندمیک با استفاده از تله نوری و آسپیراتور جمع‌آوری گردیدند. برای جمع‌آوری پشه‌ها، تله‌های نوری در اوایل شب در داخل طویله‌ها و مناطق مسکونی قرار داده شد و در اول صبح روز بعد جمع‌آوری شدند. سپس در آزمایشگاه پشه‌خاکی‌های ماده خونخواری کرده، به کمک لوپ جدا و هر کدام به طور جداگانه در محیط NNN وارد و کشت داده شدند. از بین بیش از ۱۰۰ پشه‌خاکی صید شده از مناطق فوق، تنها ۳ نمونه به طور استریل و با موفقیت کشت داده شدند.

کشت انگل‌ها

مواد بیولوژیکی آسپیره شده از ۳۸ منبع انسانی و حیوانی (۱۲ انسان و ۲۶ سگ و انبوهی از پشه‌خاکی‌ها) در محیط کشت NNN در حرارت ۲۴ درجه سانتی‌گراد برای رشد و جداسازی و در نهایت شناسایی گونه‌های لیشمانیا کشت داده شدند (۹). به منظور مشاهده میکروسکپی انگل‌ها اسمیر تهیه و بعد از فیکساسیون با رنگ گیمسا رنگ‌آمیزی گردیدند. پشه‌خاکی‌ها هرکدام در محیط جداگانه NNN وارد شده و تنها در ۳ مورد بعد از تهیه اسمیر، انگل مشاهده گردید. به

جدول ۱ : منابع WHO مورد استفاده برای تعیین گونه‌های لیشمانیا با استفاده از ایزوآنزیم الکتروفورزیس

Code	Clinical condition	Species	Zymodeme
MHOM/TN/80/IPT1	VL	L. infantum	LON-49
MHOM/IN/80/DD8	VL	L. donovani	LON-41
MCAN/IT/76/ DORA	VL	L.donovani	LON-50
MHOM/ET/67/ LV9	VL	L.donovani	LON-46
MHOM/SU/74/K27	ACL	L. tropica	LON-12
MHOM/SU/73/5ASKH	ZCL	L. major	LON-1

منظور استریل نبودن شرایط کشت از نظر آلودگی‌های قارچی و باکتریال و به‌رغم اضافه کردن ضدقارچ (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر۵-فلوروسیتوزین)و ضدباکتری (۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر جنتامایسین) تنها ۲۱ مورد از ۲۶ مورد تایید شده میکروسکپی، کشت مثبت و عاری از آلودگی داشتند. بنابراین فقط ۲۱ مورد از نمونه‌های سگی برای انجام مراحل بعدی باقی ماندند. کشت‌های منفی حداقل به مدت ۶ هفته قبل از دور ریختن مورد بررسی قرار گرفتند. کشت‌های به دست آمده با پاساژهای متوالی (حداکثر چهار پاساژ) در محیط اسلاپی نگهداری شدند. کشت‌ها برای انجام مراحل بعدی به لندن منتقل شدند و به محض رشد کشت‌ها با روش‌های استاندارد (۹و۱۰)، در نیتروژن مایع برای تعیین ایزوآنزیم‌ها نگهداری شدند. نمونه‌ها World Health Organization International Reference Center cryo-bank وارد شده و توسط واحد بیماری‌های عفونی و گرمسیری دانشکده بهداشت و بیماری‌های گرمسیری دانشگاه لندن نگهداری شد.

کشت فله‌ای پروماستیگوت

۳۶ ایزوله پایدار و فریز شده، ذوب و در محیط N.N.N کشت داده شد و سپس به محیط کشت آلفا -MEM تغییر یافته به شماره کاتالوگ M۰۶۴۴ سیگما حاوی ریبونوکلئوزیدها، دزاکسی ریبونکلئوزیدها و ال‌گلوتامات در ۲۴ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. محیط آلفا- MEM حاوی ۵۴۸ میلی گرم ال‌گلوتامات، ۳ میلی‌گرم د-گلوکز، ۵ میلی‌گرم فولیک اسید، ۲ میلی‌گرم بیونین، ۱۱ گرم سدیم بیکربنات (۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و جنتامایسین برای به حداقل رساندن آلودگی باکتریایی بود. pH محیط در ۷/۵ تنظیم و ۱۰ درصد سرم غیرفعال شده جنین گاو (در حرارت ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه) به آن افزوده شد (۹).

استخراج آنزیم‌های محلول

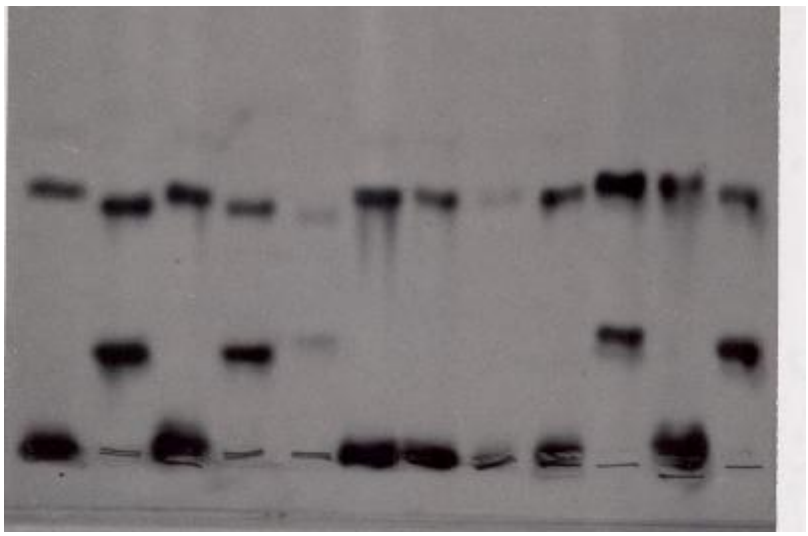
آنزیم‌های محلول برای آماده‌سازی برای الکتروفورز با روش‌های استاندارد استخراج گردیدند (۹و۱۰). پروماستیگوت‌ها از محیط کشت برداشت شده و پس از دوبار شستشو در بافر نمکی فسفات (PBS) با pH=۷ ، سوسپانسیون آنزیم‌ها در محیط پایدارکننده حاوی ۲میلی‌مول دی‌تیوتریتول (DTT) ،۲میلی‌مول ای- آمینو کاپروئیک اسید (ACA) و ۲میلی‌مول EDTA با pH= ۷ تهیه شد. با سه بار انجماد و ذوب متوالی در نیتروژن مایع و سانتریفوژ با سرعت بالا (<g ۱۳۰۰۰) انگل لیز و ۱۵ میکرولیتر از مایع روئی برداشته شد و در نیتروژن مایع چکانده شد که به دانه‌های منجمد شده (Beeds) تبدیل گردیدند. دانه‌های به دست آمده در نیتروژن مایع نگهداری شدند.

آنزیم‌های مطالعه شده آلانین آمینو ترانسفراز (ALAT)، EC.2.6.1.2 : آسپارتات آمینو ترانسفراز (ASAT)، EC.2.6.1.1: سوپر اکسید دسموتاز (SOD)، EC.1.15.1.1: استراز (ES) EC.3.1.1.1: نوکلئوزید هیدرولاز (NH) EC.3.2.2.2: مانوز فسفات ایزومراز (MPI) EC.5.3.1.8: گلوکز فسفات ایزومراز (GPI) EC.5.3.1.9: مالات دهیدروژناز (MDH) EC1.1.1.37: ۶- فسفو گلوکونات دهیدروژناز EC1.1.1.44 (6PGD): فسفو گلوکوموتاز (PGM) EC.2.7.5.1: پرولین ایمینو پپتیداز (PEP-D) EC.3.4.11.5 و پیروات کیناز (PK) EC.2.7.1.40 بودند.

گونه‌های مرجع و گونه‌های ایزوله شده از ایران در جدول شماره یک آمده است.

الکتروفورز ایزوآنزیم‌ها

از الکتروفورز در لایه نازک نشاسته برای شناسایی گونه‌ها استفاده شد (۹و۱۰). ژل از نشاسته سیب زمینی ۱۱/۲۵ درصد و در لایه‌ای به ضخامت یک‌میلی‌متر (در ابعاد ۱۴cm×۲۱/۵cm) تهیه گردید (۱۰). پروفایل‌های آنزیمی با گونه‌های مرجع WHO لیشمانیا (لیشمانیا) دونووانی (DD8)، لیشمانیا (لیشمانیا) اینفانتوم (IPT-1)، لیشمانیا (لیشمانیا) تروپیکا (K-27) و



1) MHOM/TN80/IPT1 ref, 2) MHOM/SU/74/K27 ref, 3) MHOM/IN/80/DD8 ref, 4) MHOM/SU/73/5ASKH ref
5) MHOM/IR/05/HAJL1, 6) MHOM/IR/06/MAZ-h6, 7) MHOM/IR/06/MAZ-h9, 8) MCAN/IR/05/MAZ-d3
9) MCAN/IR/06/MAZ-d7, 10) MHOM/IR/04/YaghoobiL2, 11) MSAN/IR/06/MAZ-s2, 12) MHOM/IR/05/HajaranL1

تصویر ۱ : نمونه‌های ۱ تا ۴ سوش‌های رفرانس ، نمونه‌های ۵ ، ۱۰ و ۱۲ از بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی (ایران)

نمونه‌های ۶ و ۷ از بیماران مبتلا به لیشمانیوز احشائی (ایران) ، نمونه‌های ۸ و ۹ از طحال سگ‌های آلوده ، نمونه ۱۱ از پشه خاکی

لیشمانیا (لیشمانیا) ماژور(5-ASKH) مقایسه شدند.

یافته‌ها

پروفایل ایزوآنزیم‌های به دست آمده از ۱۲ بیمار مبتلا به کالاآزار و ۲۱ ایزوله از سگ‌ها و ۳ نمونه پشه‌خاکی از گونه مرجع لیشمانیا اینفانتوم (MHOM/TN/80/IPTI) زیمودم (MON≅LON-49) قابل افتراق نبودند. آنها به وضوح از پروفایل گونه لیشمانیا دنوانی (MHOM/TN/80/DDT) زایمودم LON41، لیشمانیاماژور (MHOM/SU/73/5ASKH) زایمودم LON1 و لیشمانیا تروپیکا (MHOM/SU74/K27) زایمودم LON12 متفاوت بودند (تصویر یک). تمام گونه‌های جدا شده لیشمانیا از بیماران مبتلا به لشمانیوز احشایی و سگ‌ها و پشه‌خاکی‌ها در شمال غرب به احتمال زیاد از گونه لیشمانیا اینفانتوم و زایمودم LON-49 بودند.

بحث

مطالعه اخیر حول سه محور میزبان حیوانی، ناقل و میزبان انسانی طراحی گردیده است و همان‌گونه که نتایج نشان می‌دهد، در تمام موارد یافته‌ها مشابه و حاکی از این بود که هر سه در چرخه زندگی این انگل در منطقه دارای نقش بوده است. به‌عبارتی بیماری در این ناحیه زئونوتیک (ZVL) می‌باشد. در این مطالعه فلبوتوموس کاندلاکئی و پرفیلوی به عنوان ناقلین بیماری و سگ‌ها به عنوان میزبان مخزن لشمانیوز احشایی در کانون‌های آندمیک شمال غرب ایران به اثبات رسید.

به طور مشابه هر ۳۹ نمونه وارد شده در این تحقیق غیرقابل افتراق از گونه لیشمانیا اینفانتوم (MHOM/TN/80/IPTI) زایمودم (MON≅LON-49) بودند. بنابراین کانون لشمانیوز احشایی در شمال غرب ایران به روشنی یک کانون مدیترانه‌ای احشایی می‌باشد که از پرتغال و مراکش و از پاکستان و آسیای مرکزی به شرق کشیده شده است و همان زایمودم از لیشمانیا اینفانتوم (MON≅LON-49) که در موارد لشمانیوز احشایی انسان در شمال غرب ایران در بیماران لشمانیوز احشایی به‌دست آمده بود، از بیماران لشمانیوز احشایی پاکستان (۱۱)، عراق (۱۲)، اسرائیل (۱۳)، ترکیه (۱۴)، آسیای مرکزی مثل جمهوری آذربایجان (۱۵)، منطقه مدیترانه (۱۶)، یونان (۱۷)، پرتغال (۱۸و ۱۹)، ایتالیا (۲۰)، گرجستان (۲۱)، فرانسه (۲۲)، قبرس (۲۳)، آفریقا مثل الجزایر (۲۴)، مصر (۲۵) و سودان (۲۶) گزارش شده است. این زایمودم شایع‌ترین زایمودم بوده و به طور وسیعی در بین زایمودم‌های لیشمانیا اینفانتوم پخش شده است. پروفایل ایزوآنزیم‌های به دست آمده از سگ‌ها و

پشه‌خاکی‌ها با نمونه‌های انسانی مقایسه شدند. تمام گونه‌های جدا شده از هر سه مورد مشابه و از گونه لیشمانیا اینفانتوم (MHOM/TN/80/IPTI) زایمودم (MON≅LON-49) بودند. الگوی پخش سنی لیشمانیوز احشایی لیشمانیا اینفانتوم که در شمال‌غرب ایران دیده می‌شود و تشابه میزبان مخزن، به عامل مشترک اتیولوژیک مسؤول لشمانیوز احشایی در چند کشور جهان اشاره دارد.

نتیجه‌گیری

با توجه به یافته‌های پژوهش می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که در استراتژی‌های مقابله با این بیماری که به طور روز افزونی رو به افزایش است (تا پایان سال ۱۹۹۳، ۵۵۴۹ مورد بیماری از ۲۸ استان گزارش شده است.) (۲۷)، با توجه به یکسان بودن نوع انگل در انسان، ناقل و مخزن می‌بایست روی هر سه توجه داشت و اقدامات پیشگیری و کنترل را روی آنها اعمال کرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح‌های تحقیقاتی مرکز تحقیقات کاربرد دارویی تبریز به شماره‌های ۶۵-۸۲، ۶۴-۸۲ و ۶۳-۸۲ بود. از همکاران مراکز بهداشتی شهرستان‌های اهر و کلیبر و بخش انگل‌شناسی مرکز تحقیقات کاربردی و داروئی دانشگاه علوم پزشکی تبریز کمال تشکر و قدردانی را می‌نماییم.

References

1) Campino L, Pratlong F, Abranches P, Rioux JA, Santos-Gomes G, Alves-Pires C, et al. Leishmaniasis in Portugal: enzyme polymorphism of Leishmania infantum based on the identification of 213 strains. *Trop Med Int Health*. 2006;11(11):1708-14.

2) Kenneth DM. Clinical Laboratory medicine. Second Ed. Philadelphia. Lipincoatt Williams & wilkins. 2002; pp:1299-1300.

3) Gavgani AS, Mohite H, Edrissian GH, Mohebali M, Davies CR. Domestic dog ownership in Iran is a risk factor for human infection with Leishmania infantum. *Am J Trop Med Hyg*. 2002; 67(5):511-5.

4) Edrissian GH. Visceral leishmaniasis in Iran and the role of serological tests in diagnosis and epidemiological studies. In: Ozcel A, Alkan MZ, eds. Parasitology for 21st Century. ICOPA VIII, Izmir, Turkey: CAB International; 1996; pp:63-78.

5) Peters W, Chance L, Mutiga MJ, Nogoka JM, Schnur f. The identification of human and animal isolates of leishmania from Kenia.Ann. *Trop Med Parasitol*. 1977;71(4):501-502.

6) Toledo A, Martín-Sánchez J, Pesson B, Sanchiz-Marin MC, Morillas-Márquez F. Genetic variability within the species Leishmania infantum by RAPD. *Mol Biochem Parasitol*. 2002; 119:257–64.

7) Kenneth DM. Clinical Laboratory medicine. Second Ed. Philadelphia. Lipincoatt Williams & wilkins. 2002; 1370-1371.

8) World Health Organization. Control of the leishmaniases: report of a WHO Expert Committee. Geneva. WHO Technical Report. 1990; Series No 793.

9) Evans DA, Lanham SM, Baldwin CI, Peters W. The isolation and isoenzyme characterization of Leishmania braziliensis subsp. from patients with cutaneous leishmaniasis acquired in Belize. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1984;78(1):35-42.

10) Evans D, Godfrey D, Lanham S, Lanotte G, Modabber F, Schnur L. In: Handbok on isolation, characterization and cryopreservation of Leshmania. Evans D. (editor). Geneva. UNDP/WHO. 1989; pp. 15-4.

11) Rab MA, Frame IA, Evans DA. The role of dogs in the epidemiology of human visceral leishmaniasis in northern Pakistan. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1995;89(6):612-5.

12) Aljeboori T, Evans DA. Leishmania spp. in Iraq, Electrophoretic isoenzyme pattern 1 Visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1980; 74(2): 169-177.

13) Ya'ari A, Jaffe CL, Garty BZ. Visceral leishmaniasis in Israel, 1960-2000. *Isr Med Assoc J*. 2004;6(4):205-8.

14) Sakru N, Korkmaz M, Ozbel Y, Ertabaklar H, Sengul M, Toz SO. Investigation of asymptomatic visceral leishmaniasis cases using western blot in an endemic area in Turkey. *New Microbiol*. 2007; 30(1):13-8.

15) Tagi-zade TA, Gasanzade GB, Saf'ianova VM, Shal'miev GB, Gadzhibekova EA. Visceral leishmaniasis in Ordubad District, Nakhichevan ASSR. *Med Parazitol (Mosk)*. 1989;(3):22-7.

16) Ferroglio E, Romano A, Trisciuoglio A, Poggi M, Ghiggi E, Sacchi P, et al. Characterization of Leishmania infantum strains in blood samples from infected dogs and humans by PCR-RFLP. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2006; 100(7):636-41.

17) Maltezou HC, Siafas C, Mavrikou M, Spyridis P, Stavrinadis C, Karpathios T, et al. Visceral leishmaniasis during childhood in southern Greece. *Clin Infect Dis*. 2000; 31(5):1139-43.

18) Abranches P, Santos-gomes GM, Campio L. Epidemiology of Leishmaniasis in Portugal. *Archs. Inst. Pasteur Tunis*. 1993; 70 (3-4): 349-355.

19) Campino L, Pratlong F, Abranches P, Rioux JA, Santos-Gomes G, Alves-Pires C, et al. Leishmaniasis in Portugal: enzyme polymorphism of Leishmania infantum based on the identification of 213 strains. *Trop Med Int Health*. 2006;11(11):1708-14.

20) Gramiccia M, Gradoni L, Angelici MC. Epidemiology of Mediterranean leishmaniasis caused by Leishmania infantum: Isoenzyme and kDNA analysis for the identification of parasites from man and vector and reservoirs. In Leishmaniasis: the current status and New strategies for control, NATO-ASI Series A.

163(ed. Hart, DJ). New York press. 1989; pp 21-37.

21) Bardzhadze GB, Saf'ianova VM. Serological study of the Leishmania strains isolated from a sick child and dog in a focus of visceral leishmaniasis in the Georgian SSR. *Med Parazitol (Mosk).* 1979; 48(3):41-4.

22) Rosenthal E, Marty P, Poizot-Martin I, Reynes J, Pratlong F, Lafeuillade A, et al. Visceral leishmaniasis and HIV-1 co-infection in southern France. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1995; 89(2):159-62.

23) Ozbel Y, Turgay N, Ozensoy S, Ozbilgin A, Alkan MZ, Ozcel MA, et al. Epidemiology, diagnosis and control of leishmaniasis in the Mediterranean region. *Ann Trop Med Parasitol.* 1995; 89 Suppl 1:89-93.

24) Harrat Z, Berrouane Y, Ben Abdesslam S, Belkaid M, Tabet-Derraz O. Visceral leishmaniasis in Algeria. Evolution of visceral leishmaniasis in the Grande Kabylie area (1985-1990). *Arch Inst Pasteur Alger*. 1992;58:255-72.

25) Londner MV, Feinsod FM, Faris R, Rosen G, El Said S, Saah AJ. Persistence of human leishmanial antibodies in an endemic area of visceral leishmaniasis in El Agamy, Egypt. *European Journal of Epidemiology.* 1988; 4: 473-476.

26) Seaman J, Ashford RW, Schorscher J, Dereure J. Visceral leishmaniasis in southern Sudan: status of healthy villagers in epidemic conditions. *Ann Trop Med Parasitol.* 1992;86(5):481-6.

27) Edrissian GH. Leishmaniasis in Iran. *Acta Parasitol.* 1997; 21(1): 129.