

## شناسایی گونه و زیر گونه‌های لیشمانیاهای جدا شده از بیماران کالا آزار در شمال غرب ایران

دکتر عبدالصمد مظلومی<sup>۱</sup>، دکتر حیدر اسماعیلی<sup>۲</sup>، دکتر کلا یود یوس<sup>۳</sup>

### چکیده

پیش زمینه و هدف: لیشمانیازیس یک اصطلاح کلی است که به بیماری ایجاد شده توسط هر عضوی از گونه پروتوزوان لیشمانیا اطلاق می‌گردد و آنرا به سندرم‌های احشایی (کالا آزار) جلدی و مخاطی می‌توان تقسیم کرد. جهت مطالعات اپیدمیولوژیک شناسایی گونه‌ها و زیر گونه‌ها لیشمانیا در هر منطقه آندمیک ضروری است. هدف از این بررسی تعیین گونه‌ها و زیر گونه‌های لیشمانیا در بیماران لیشمانیوز احشایی بر اساس الگوی ایزوآنزیمی در مناطق آندمیک شمال غرب ایران و تعیین میزبان مخزن براساس مقایسه الگوی ایزوآنزیمی مخازن با الگوی ایزوآنزیمی بیماران می‌باشد.

تمایل روزافزون برای انجام اعمال جراحی به شیوه سرپایی، نیاز به ترکیبات وریدی کوتاه اثر با حداقل عوارض جانبی و هزینه مناسب را بیشتر کرده است. در این مطالعه از پروپوفل به‌عنوان داروی اصلی هوشبر و از دو داروی کتامین و فنتانیل جهت بی‌دردی در جراحی‌های سرپایی استفاده شده، اثرات بالینی این دو ترکیب با یکدیگر مقایسه شده‌اند.

مواد و روش: از ۳۲ مورد آسپیراسیون مغز استخوان از بیماران کالا آزار پس از کشت در محیط نیمه جامد ایوانز، اسلای و  $N_1, N_2, N_3$  فقط در ۲۱ مورد دوازده نوع آنزیم با روش الکتروفورز نشاسته با لایه نازک مورد مطالعه قرار گرفتند.

یافته‌ها: پروفایل آنزیم‌های لیشمانیاهای جدا شده از مغز استخوان ۲۱ بیمار مطابق با گونه مرجع ال اینفانتوم 49 lon سازمان بهداشت جهانی و همان پروفایلی بود که قبلاً از سگ‌های آلوده در شمال غرب ایران شناسایی شده بود بدین ترتیب ضمن ثابت شدن گونه و زیر گونه لیشمانیا در بیماران کالا آزار میزبان مخزن مربوطه نیز در شمال غرب ایران شناسایی شد.

نتیجه‌گیری: یافته‌ها نشان داد که کانون آندمیک لیشمانیوز احشایی در شمال غرب ایران به روشنی یک کانون مدیترانه‌ای لیشمانیوز احشایی می‌باشد.

گل‌واژگان: لیشمانیا، ایزوآنزیم، الکتروفورز، کالا آزار

مجله پزشکی ارومیه، سال پانزدهم، شماره اول، ص ۴۶-۳۹، بهار ۱۳۸۳

آدرس مکاتبه: تبریز - خیابان دانشگاه، روبروی بیمارستان امام خمینی، مرکز تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی تبریز  
بخش انگل‌شناسی - دکتر عبدالصمد مظلومی

۱- استادیار انگل‌شناسی بالینی - مرکز تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی تبریز

۲- استادیار پاتولوژی بالینی و تشریحی - دانشگاه علوم پزشکی تبریز

۳- استاد اپیدمیولوژی - دانشکده طب گرمسیری و بهداشت - دانشگاه لندن

## مقدمه

لیشمانیازیس گروهی از بیماری‌های عفونی هستند که به عنوان یک مشکل مهم سلامتی در سراسر دنیا شناخته شده‌اند. این بیماری‌ها در ۸۸ کشور شایع بوده و بیش از ۳۵۰ میلیون نفر در معرض گرفتاری قرار دارند ۱۲ میلیون نفر به نوعی از لیشمانیازیس گرفتارند و شیوع سالانه آن ۵۰۰۰۰۰ لیشمانیوز احشایی و ۱-۱/۵ میلیون نفر لیشمانیوز جلدی است (۱،۲،۳،۴). لیشمانیازیس توسط گروهی از انگل‌های پروتوزوا ایجاد می‌شوند که به وسیله پشه خاکی‌ها (فلبوتومین<sup>۱</sup>) در دنیای قدیم و لوتزومیا<sup>۲</sup> در دنیای جدید منتقل می‌شوند (۴) هر عضوی از گروه لیشمانیا، انتشار جغرافیایی خاص و تمایل به ایجاد بیماری منحصر به فرد دارند (۵،۶). در حال حاضر لیشمانیوز احشایی در ایران در تمام ۲۷ استان به صورت تک‌گیر (اسپورادیک) وجود دارد. و حداقل در استان‌های اردبیل، آذربایجان شرقی و استان فارس در جنوب ایران به صورت آندمیک وجود دارد. در استان‌های آندمیک بیش از ۵۰٪ از بیماران لیشمانیوز احشایی بچه‌های زیر دو سال و ۹۰٪ آنها زیر ۱۲ سال می‌باشند (۷،۸،۹،۱۰).

گونه‌های مختلف لیشمانیا را نمی‌توان با مورفولوژی از هم‌دیگر افتراق داد. قبلاً جدا کردن آنها به گونه‌ها و زیرگونه‌ها براساس سندرم‌های کلینیکی، پخش جغرافیایی، مخازن مخصوص حیوانی و گونه‌ای از پشه‌های خاکی که عامل انتقال می‌باشند، بوده است. اخیراً بکارگیری روش‌های تاکسونومیک ژنتیک مثل آنالیز DNA کینتوپلاست، الگوهای ایزوآنزیم و تست‌های سرولوژیک منجر به تغییراتی در تقسیم‌بندی شده و احتمالاً به تغییرات بیشتری در آینده منجر خواهد شد (۲،۶). از میان روش‌های تاکسونومیک ذکر شده امروزه روش ایزوآنزیم الکتروفوریزس به عنوان استاندارد اصلی در نظر گرفته می‌شود. روش آنالیز DNA کینتوپلاست در بعضی از موارد نمی‌تواند

دوگونه را از هم‌دیگر افتراق دهد (۱۱،۱۲).

ایزوآنزیم‌ها از جنس پروتئین بوده و ساختمان آنها بر حسب هرگونه‌ای از لیشمانیا متفاوت است. پروفایل به یک‌سری از ایزوآنزیم‌ها گفته می‌شود. پروفایل ایزوآنزیم‌ها تهیه شده از لیشمانیاها در دنیای جدید و قدیم تفاوت‌های زیادی بین گونه‌ها و تفاوت‌های کوچکتر در داخل هرگونه نشان داده است. جمعیتی از انگل‌ها در یک‌گونه که با سایرین در حرکت تعدادی از آنزیم‌های اختصاصی در الکتروفورز تفاوت داشته باشند زیمودم<sup>۳</sup> نامیده می‌شوند (۱۲). آنزیم‌های متفاوتی جهت افتراق لیشمانیاها به کار می‌رود و تا حدود ۲۰ آنزیم به صورت روتین استفاده می‌شود تا ثبات و پایداری این سیستم مشخص شود (۱۲). این تکنیک به صورت وسیعی مورد استفاده است و به فهم ما از اپیدمیولوژی بیماری در جاهایی که مخازن و حاملان لیشمانیوز انسانی مشخص شده‌اند، کمک می‌کند. این روش قابل اعتمادترین و حساس‌ترین روش بیوشیمی موجود برای شناسایی و توصیف اختصاصی لیشمانیاها می‌باشند (۲۰، ۱۹، ۱۸، ۱۷، ۱۶، ۱۵، ۱۴، ۱۳، ۱۲، ۷).

این مطالعه جهت شناسایی اختصاصی لیشمانیاها جدا شده از بیماران کالا آزار در شمال غرب ایران که منطقه آندمیک برای لیشمانیوز احشایی است، صورت گرفت.

## مواد و روش

جهت جدا سازی ارگانسم ۳۲ مورد آسپیراسیون مغز استخوان از بیماران با شواهد کلینیکی لیشمانیوز احشایی انجام شد. تمام موارد بچه‌های زیر پنج سال بودند در ۲۴ مورد با پیدا کردن آماستیگوت در اسمیرهای مغز استخوان تشخیص کالا آزار داده شد.

1. Phlebotomine
2. Lut Zomia
3. Zymodome

نوکلئوزید هیدرولاز<sup>۷</sup> EC.3.2.2.2، مانوزفسفات ایزومراز<sup>۸</sup> EC.5.3.1.8 گلوکز فسفات ایزومراز<sup>۹</sup> EC.5.3.1.9، مالات دهیدروژناز EC.1.1.1.37، ۶- فسفات فسفوگلوکونات دهیدروژناز<sup>۱۰</sup> EC.1.1.1.44، فسفو گلوکوموتاز<sup>۱۱</sup> EC.2.7.5.1، پرولین ایمینوپپتیداز EC.3.4.11.5 و پیرووات کیناز<sup>۱۲</sup> EC.2.7.1.40 بودند.

### نتایج

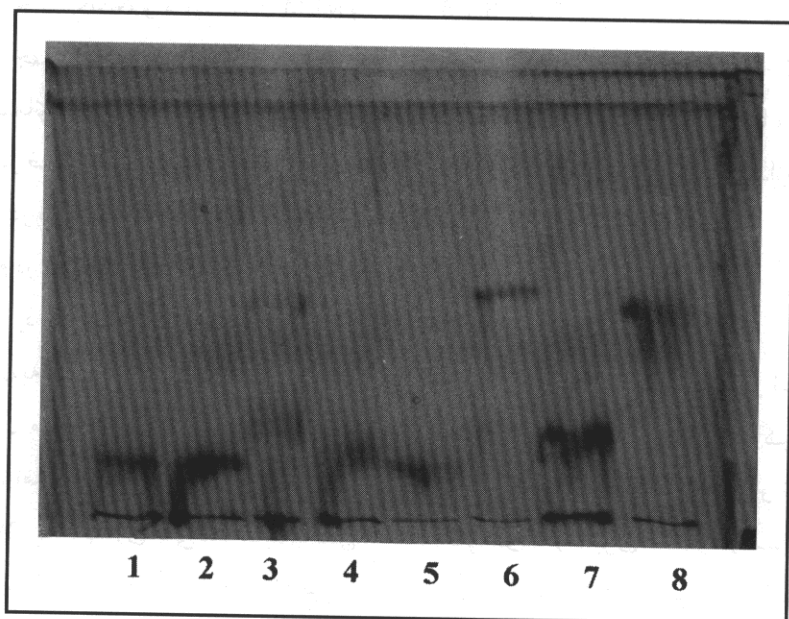
دوازده پروفایل آنزیمی مشابه و در نتیجه ۱۲ زایموم مشابه در تمام ۲۱ مورد کالا آزار مشاهده گردید. فتوگراف آنزیم‌های ۶- فسفوگلوکونات دهیدروژناز و نوکلئوزید هیدرولاز در شکل‌های ۱ و ۲ برای ده مورد از بیماران به‌عنوان نمونه به‌همراه الگوی باندهای ایزوآنزیمی برای گونه‌های مرجع لیشمانیا اینفانتوم، لیشمانیا دو نوانی کمپلکس، لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا ماژور نشان داده شده‌اند. هر دوازده آنزیم مورد مطالعه الگوی رسوب مشابه برای همه ۲۱ مورد نشان داده که با الگوی ایزوآنزیمی گونه مرجع لیشمانیا اینفانتوم مطابقت دارند. در مطالعه قبلی الگوی ایزوآنزیمی لیشمانیاهای جدا شده از سگ‌های مبتلا در منطقه شمال غرب ایران (۲۰) مشابه با الگوی بیماران کالا آزار در این مطالعه می‌باشد.

مواد بیولوژیک آسپیره شده از ۲۴ نمونه انسانی در محیط‌های نیمه جامد ایوانز اسلاپی، جامد NNN و مایع آلفا-MEM و F10 در درجه حرارت ۲۴ جهت رشد و جداسازی و در نهایت شناسایی گونه‌های لیشمانیا کشت داده شدند آلودگی‌های قارچی و باکتریال بعدی در ضمن نگهداری به‌رغم اضافه کردن ضد قارچ (۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر ۵- فلوروسیتوزین) و ضد باکتری (۵۰ میکروگرم در میلی لیتر جنتامایسین) منجر به از دست دادن سه مورد از موارد جدا شده گردید. بنابراین فقط ۲۱ مورد انگل جدا شده از انسان به‌دست آمد کشت‌ها حداقل ۶ هفته قبل از دور انداختن به‌عنوان منفی از نظر رشد مورد بررسی قرار گرفتند. کشت‌های به‌دست آمده با پاساژهای متوالی (حداکثر چهار پاساژ) در محیط اسلاپی نگهداری می‌شدند. به‌محض اینکه کشت‌ها در آزمایشگاه در لندن رشد می‌کردند، با روش‌های استاندارد (۲۱، ۱۷) در نیتروژن مایع جهت تعیین بعدی ایزوآنزیم‌ها نگهداری می‌شدند. نمونه‌ها در مرکز مرجع بین‌المللی بانک فریز<sup>۱</sup> وارد می‌شد و توسط واحد بیماری‌های عفونی و گرمسیری دانشکده بهداشت و بیماری‌های گرمسیری دانشگاه لندن نگهداری می‌شد.

کشت فله‌ای پروماستیگوت و استخراج آنزیم‌های محلول :

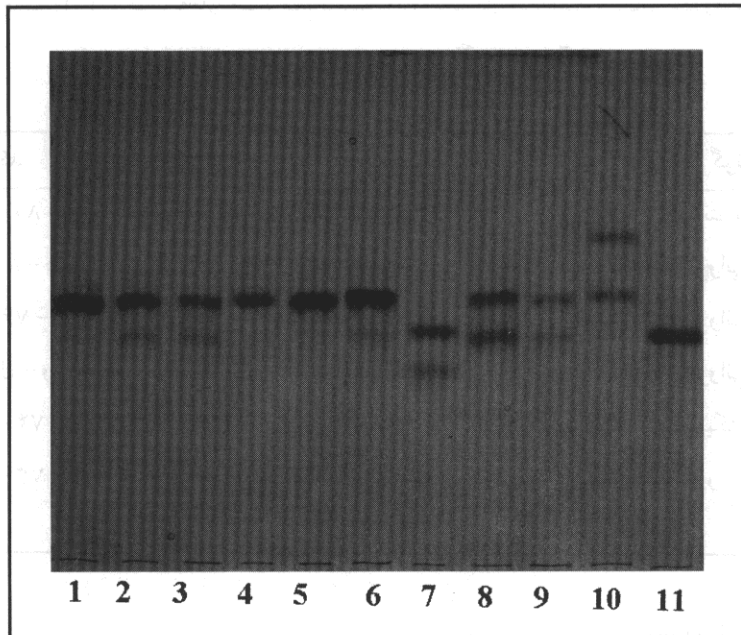
جهت استخراج آنزیم‌ها ۲۱ مورد فریز شده لیشمانیا ذوب و در روی محیط N.N.N کشت داده شد و سپس به آلفا - MEM تغییر یافته به‌شماره کاتالوگ M ۰۶۴۴ منتقل و پس از جمع‌آوری پروماستیگوت‌ها آنزیم‌های محلول با روش‌های استاندارد ایوانز و همکاران<sup>۲</sup> جهت الکتروفورز آماده شد. به‌روش الکتروفورز نشاسته بالای نازک به همان روشی که توسط ایوانز و همکاران (۱۸) شرح داده شده است الکتروفورز گردیدند. آنزیم‌های مورد مطالعه آلانین ترانسفراز<sup>۳</sup> EC.2.6.12 : آسپارات آمینو ترانسفراز<sup>۴</sup> EC.2.6.1.1 و سوپر اکسید دسموتاز<sup>۵</sup> EC.1.15.1.1 استراز<sup>۶</sup> EC.3.1.1.1

- 1- Cryo - Bank
- 2- Evans et al
- 3- ALT
- 4- ASAT
- 5- SOD
- 6- ES
- 7- NH
- 8- MPI
- 9- GPI
- 10- 6PGD
- 11- PGM
- 12- PK



شکل شماره ۱ : الگوی الکتروفورز ایزو آنزیم های لیشمانیوزهای احشایی در الکتروفورز به روش لایه نازک ژل نشاسته پس از رنگ آمیزی برای نوکلئوزید هیدرولاز.

- ۱ - پستاندار - انسان - تونس - ۸۰ - آی پی تی یک (گونه مرجع برای لیشمانیا اینفانتوم)
- ۲ - پستاندار - انسان - ایران - ۲۰۰۲ - مز - ۱۹ - (جدا شده از مغز استخوان بیمار با لیشمانیوز احشایی)
- ۳ - پستاندار - انسان - اتیوپی - ۶۷ - ال وی ۹ (گونه مرجع برای لیشمانیا دو نووانی کمپلکس)
- ۴ - پستاندار - انسان - ایران - ۲۰۰۲ - مز - ۲۰ - (جدا شده از مغز استخوان بیمار با لیشمانیوز احشایی)
- ۵ - پستاندار - انسان - ایران - ۲۰۰۲ - مز - ۲۱ - (جدا شده از مغز استخوان بیمار با لیشمانیوز احشایی)
- ۶ - پستاندار - انسان - سودان - ۷۴ - کا - ۲۷ (گونه مرجع برای لیشمانیا تروپیکا)
- ۷ - پستاندار - انسان - هند - ۸۰ - د - د - ۸ (گونه مرجع برای لیشمانیا دو نووانی کمپلکس)
- ۸ - پستاندار - انسان - سودان - ۷۳ - ۵ - ۱ - اس - خ (گونه مرجع برای لیشمانیا ماژور)



شکل شماره ۲: الگوی الکتروفورز ایزو آنزیم‌های لیشمانیوزهای احشایی در الکتروفورز به روش لایه نازک ژل نشاسته پس از رنگ آمیزی برای ۶- فسفو گلوکونات دهیدروژناز

- ۱- پستاندار - انسان - تونس - ۸۰ - آی پی تی یک (گونه مرجع برای لیشمانیا اینفانتوم)
- ۲- پستاندار - انسان - ایران - ۹۹ - مز - ۴ (جداشده از مغز استخوان بیمار با لیشمانیوز احشایی)
- ۳- پستاندار - انسان - ایران - ۹۹ - مز - ۵ (جداشده از مغز استخوان بیمار با لیشمانیوز احشایی)
- ۴- پستاندار - انسان - ایران - ۹۹ - مز - ۶ (جداشده از مغز استخوان با لیشمانیوز احشایی)
- ۵- پستاندار - انسان - ایران - ۹۹ - مز - ۷ (جداشده از مغز استخوان بیمار با لیشمانیوز احشایی)
- ۶- پستاندار - انسان - ایران - ۹۹ - مز - ۸ (جداشده از مغز استخوان بیمار با لیشمانیوز احشایی)
- ۷- پستاندار - انسان - هند - ۸۰ - د-د-۸ (گونه مرجع برای لیشمانیا دو نووانی - دو نووانی)
- ۸- پستاندار - انسان - ایران - ۹۹ - مز - ۹ (جداشده از مغز استخوان بیمار با لیشمانیوز احشایی)
- ۹- پستاندار - انسان - ایران - ۹۹ - مز - ۱۰ (جداشده از مغز استخوان بیمار با لیشمانیوز احشایی)
- ۱۰- پستاندار - انسان - سودان - ۷۳ - ۵ - ۱ - اس - خ (گونه مرجع برای لیشمانیا ماژور)
- ۱۱- پستاندار - انسان - سودان - ۷۴ - کا - ۲۷ (گونه مرجع برای لیشمانیا تروپیکا)

جدول شماره ۱: جدول ۱ - گونه‌های مرجع لیشمانیاهای سازمان بهداشت جهانی مورد استفاده برای شناسایی گونه‌های لیشمانیا در شمال غرب ایران براساس الگوهای ایزوآنزیمی

زایمودم	گونه	وضعیت کلینیکی	کد
لندن - ۴۹	لیشمانیا اینفانتوم	لیشمانیوز احشایی	پستاندار - انسان - تونس - ۸۰ - آی پی تی یک
لندن - ۴۱	لیشمانیادونووانی - دونووانی	لیشمانیوز احشایی	پستاندار - انسان - هند - ۸۰ - د - د - ۸
لندن - ۵۰	لیشمانیادونووانی - کن سولانو	لیشمانیوز احشایی	پستاندار - سگ - ایتالیا - ۷۶ - دورا
لندن - ۴۶	لیشمانیادونووانی کمپلکس	لیشمانیوز احشایی	پستاندار - اتیوپی - ۶۷ - ال - وی - ۹
لندن - ۱۲	لیشمانیا تروپیکا	لیشمانیوز جلدی آنتروپوتیک	پستاندار - انسان - سودان - ۷۴ - ی - ۲۷
لندن - ۱	لیشمانیا ماژور	لیشمانیوز جلدی ژئوتوتیک	پستاندار - انسان - سودان - ۷۳ - ۱ - اس - خ - ه

## بحث

وسعی در بین زایمودم‌های ال اینفانتوم پخش شده است. پروفایل ایزوآنزیم جدا شده از سگ‌ها با انسان مقایسه شد. لیشمانیاهای جدا شده از انسان و سگ‌ها در ۱۲ آنزیم مشابه بوده و از نظر ایزوآنزیمی غیرقابل افتراق از ال اینفانتوم LON-49 بودند. عوامل جدا شده از انسان و سگ‌ها و نیز الگوی پخش سنی لیشمانیوز احشایی ال اینفانتوم که در شمال غرب ایران دیده می‌شود و تشابه میزبان مخزن (سگ‌ها) به عامل مشترک اتیولوژیک مسئول لیشمانیوز احشایی در چند کشور جهان اشاره دارد.

همچنین این مطالعه نقش سگ‌ها به عنوان میزبان مخزن لیشمانیوز احشایی در کانون آندمیک شمال غرب ایران را ثابت کرد.

## تقدیر نامه

از زحمات بی دریغ و بی شائبه آقای اردوان قازانچائی و خانم سکینه رستم‌زاده در آزمایشگاه انگل‌شناسی مرکز تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی تبریز بی نهایت متشکریم.

قبل از این مطالعه چند مورد لیشمانیاهای جدا شده از بیماران لیشمانیوز احشایی انسان‌ها در ایران توصیف اختصاصی شده و به عنوان ال اینفانتوم<sup>۱</sup> شناسایی شده بودند. نمونه‌های سگ‌ها هم تعیین گونه و شناسایی گردیده بودند (۲۰، ۱۰). مشابه همه ۲۱ مورد جدا شده در این مطالعه از نظر ایزو آنزیم‌ها غیرقابل افتراق از گونه ال اینفانتوم LON-49 با زایمودم MHOM/IN/80/IPT1 بودند. بنابراین کانون لیشمانیوز احشایی در شمال غرب ایران به روشنی یک کانون مدیترانه‌ای لیشمانیوز احشایی می‌باشد که از پرتغال و مراکش و از پاکستان و آسیای مرکزی به شرق کشیده شده است. همان زایمودم از ال اینفانتوم (LON-49, MON-1) که در موارد لیشمانیوز احشایی انسان در شمال غرب ایران شناسایی شده بود در بیماران لیشمانیوز احشایی از پاکستان، عراق، ترکیه، آسیای مرکزی مثلاً جمهوری آذربایجان (۱۲)، منطقه مدیترانه، پرتغال، جورجیا، آمریکای لاتین در بیماران لیشمانیوز احشایی انسان پیدا شده است این زایمودم شایع‌ترین زایمودم بوده و به صورت

1. L. Infantam

## References

- 1- Mandell D B: Principles & practice of infectious disease. 5<sup>th</sup> ed, New York, CHURCHILL Livingstone, 2000: 2831.
- 2- Peters W, Evans D A, Lanham S M: Importance of parasite identification in cases of leishmaniasis. J Royal Soc Med, 1983, 76: 540-542.
- 3- Grimaldi G Jr, Tesh R B, Mc Mahon P D: A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. Am J Trop Med Hyg. 1989, 41: 687-725.
- 4- World Health Organisation, expert committee on the Control of the leishmaniases. Technical report series 739, 1990 Geneva.
- 5- Parrick R M: Manual of clinical microbiology. 7th ed, Washington DC, ASM press, 1999: 1365-1373.
- 6- kenneth DM: Clinical Laboratory medicine. 2nd ed ,philadelphia, Lippincott williams & wilkins, 2002: 1299-1300.
- 7- Edrissian GH, Hafizi A, Afshar A, Soleimanzadeh G, Movahed-Danesh A M, Garoussi A: An endemic focus of visceral leishmaniasis in Meshkin-shahr, East Azerbaijan province, north-west part of Iran and IFA serological survey of the disease in this area. Bull soc pathol Exo, 1988, 81: 238-248.
- 8- Edrissian GH: Kala-azar in Iran (Review Article). Med Islamic Repub Iran, 1990, 4, 3, fall: 235-238
- 9- Edrissian GH: Leishmaniasis in Iran. Acta Parasitol Turc 1997, 21(1): 129.
- 10- Edrissian GH: Visceral leishmaniasis in Iran and the role of serological tests in diagnosis and epidemioloical studies. kerman uni med sci. 1996, 3(2): 97-108.
- 11- Antonio T, Joaquina MS, Bernal P, Cesarea SM, Francico MM: Genetic variability within the species *Leishmania infantum* by RAPD: A Lack of Corolation with zymodeme structure. Molec Biochem parasitol. 2002, 119: 257-264.
- 12- Masum MA: Parasitological, clinical and sero-epidemiological studies of viscera leishmaniasis in Bangladesh. Unpublished PhD thesis. faculty of Medicine, University of London, UK, 1997.
- 13- Peters W, Chance M L, Mutinga M J Ngoka J M, Schnur L F: The identification of human and animal isolates of *Leishmania* from Kenya. Ann Trop Med parasitol, 1977, 71(4): 501-502.
- 14- Peters W, Elbihari S Ching L, Le Blancq S M, Eveans D A, Killic-Kendrich R, Smith V,

- Baldwin C I: *Leishmania* infecting man and animals in Saudi Arabia. I. General survey. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1985, 79: 831-939.
- 15- Chance M L, Schnur L F, Thomas S C, Peters W: The biochemical and serological taxonomy of *Leishmania* from the Ethiopian zoo-geographical region of Africa. *Ann Trop Med Parasitol*. 1978, 72(6): 533-542.
- 16- Aljeboori T I, Evans D A: *Leishmaniasis* in Iraq: Electrophoretic isoenzyme patterns, I visceral leishmaniasis *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1980, 74(2): 169-177.
- 17- Zhi-Biao X, Le Blancq S, Evans D A, Peters W: The characterization by isoenzyme electrophoresis of *Leishmania* isolated in the People's Republic of China, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1984, 78: 689-693.
- 18- Evans D A, Lanham S M, Baldwin C I, Peters W: The isolation and isoenzyme characterization of *Leishmania braziliensis* spp from patients with cutaneous leishmaniasis acquired in Belize, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1984, 78: 35-42.
- 19- Le Blancq S M, Peters W: *Leishmania* in the Old world: 4: the distribution of *L. donovani sensu lato* zymodemes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene*, 1986, 80: 367-377.
- 20- Mazloumi Gavganil AS, Mohite H, Edrissian GH, Mohebbi 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: 511-515.
- 21- 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, vectors and reservoirs. *Infection and immunity*, 2001, 69(12): 7365-7373.