جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

# بررسی ویرولانس انگلهای لیشمانیای جدا شده از بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی در محیط آزمایشگاهی

**دکتر بهادر سرکاری** *
**حسن رضا نژاد** **
**دکتر غلامرضا حاتم** ***
**دکتر محمد حسین معتضدیان** ***
**دکتر علی میرجلیلی** ****

* دکترای ایمونولوژی ، استادیار و عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، دانشکده پزشکی ، گروه ایمونولوژی
** کارشناس ارشد انگل شناسی، شیراز ، بیمارستان شهید بهشتی، آزمایشگاه
*** دکترای انگل شناسی، دانشیار و عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی ، گروه انگل شناسی
**** دکترای ایمونولوژی ، استادیار و عضو هیئت علمی مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی، حصارک کرج

تاریخ وصول : ۱۳۸۴/۵/۲
تاریخ پذیرش : ۱۳۸۴/۶/۱۵

**مؤلف مسئول: دکتر بهادر سرکاری**
**پست الکترونیک : sarkarib@yahoo.com**

**چکیده:**

**مقدمه و هدف:** لیشمانیوز جلدی از بیماریهای انگلی است که به وسیله انگل لیشمانیا ایجاد می شود. تظاهرات بالینی این بیماری با توجه به گونه انگل مولد بیماری، ویرولانس انگل و همچنین پاسخهای میزبان متفاوت بوده و از ضایعات پوستی محدود پاپولی شکل تا انواع ضایعات ملتهب گسترده و یا ضایعات مزمن لوپوئید متغیر است. این مطالعه با هدف بررسی ویرولانس انگلهای جدا شده از بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی در استان فارس صورت گرفته است.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه تجربی انگلهای جدا شده از زخم بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی مراجعه کننده به بخش انگل شناسی دانشکده پزشکی شیراز در سال ۱۳۸۳در محیط های کشت انگل تکثیر گردیدند. از تعداد ۲۰ نمونه تهیه شده ۶ نمونه به کشت انبوه رسیده و جهت بررسی قدرت تهاجمی انگل از رده سلولی ماکروفاژ J۷۷۴ استفاده گردید. ماکروفاژها در محیط آر پی ام آی حاوی سرم جنین گوساله ۱۰ درصد کشت داده شده و سپس با فرم متاسیکلیک انگل به نسبت ۱ به ۱۰ مجاور گردیدند. پس از مدت زمان ۳ روز با شمارش صد ماکروفاژ، درصد آلودگی ماکروفاژها و همچنین میانگین تعداد انگلهای موجود در هر ماکروفاژ محاسبه گردید. یافته های آزمایشگاهی به کمک نرم افزار SPSS و آمار توصیفی تجزیه و تحلیل گردیدند .

**یافته ها:** نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ویرولانس انگلهای جدا شده از بیماران مختلف در لیشمانیوز جلدی متفاوت می باشد به گونه ای که درصد آلودگی ماکروفاژها در ایزوله های مختلف از ۱۰ تا ۶۳ درصد متفاوت بوده و میانگین تعداد انگلهای درون ماکروفاژ از ۸ تا ۲۷ عدد متفاوت بوده است. نتایج این بررسی همچنان مشخص نمود که میان شکل ضایعات و قدرت تهاجم انگلها به ماکروفاژها ارتباط وجود دارد به گونه ای که انگلهای با ویرولانس بالا ایجاد فرمهای حادتری از بیماری با زخمهای گسترده تر نموده اند. بررسی محل سکونت بیماران و قدرت تهاجم ماکروفاژی انگلهای جدا شده از آنان مشخص نمود که میان این دو فاکتور تفاوت معنی داری وجود نداشته و این بدان معنی است که انگلهای با ویرولانس بالا در تمامی مناطق مورد مطالعه پراکنده می باشند.

**نتیجه گیری:** انگلهای جدا شده از بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی دارای ویرولانس متفاوت بوده و این تفاوت می تواند علت تنوع ضایعات پوستی در لیشمانیوز جلدی باشد. شناسایی سوش های با ویرولانس زیاد و بررسی تفاوتهای مولکولی و بیوشیمیایی آنها می تواند در جهت استفاده از این سوشها در تهیه واکسن مناسب علیه لیشمانیوز جلدی و همچنین مطالعات مرتبط با دارو درمانی مفید واقع گردد.

**واژه های کلیدی: لیشمانیوز جلدی، ویرولانس، ماکروفاژ J ۷۷۴**

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

**مقدمه**

لیشمانیوز از بیماریهای انگلی است که به وسیله تک یاخته ای از جنس لیشمانیا ایجاد می شود. سه نوع اصلی این بیماری شامل لیشمانیوز جلدی، احشایی و جلدی ـ مخاطی بوده که در نقاط مختلف جهان دیده می شود. لیشمانیوز جلدی و احشایی به صورت آندمیک در قسمتهای مختلف ایران دیده می شود (۱). سالانه ۱/۵-۱ میلیون نفر به لیشمانیوز جلدی مبتلا می شوند که از این تعداد ۹۰ درصد موارد در کشورهای افغانستان، الجزایر، برزیل، ایران، عربستان سعودی، پرو و سوریه اتفاق می افتد )۲). استانهای فارس، اصفهان، خوزستان، یزد و خراسان از کانونهای مهم لیشمانیوز جلدی محسوب می شوند (۱). عامل مولد لیشمانیوز جلدی در ایران لیشمانیای ماژور[۱] که مولد فرم روستایی یا مرطوب بیماری و لیشمانیای تروپیکا[۲] که مولد فرم خشک یا شهری بیماری می باشد(۳). علایم بالینی لیشمانیوز جلدی بسته به گونه و سوش ایجاد کننده انگل متفاوت بوده که از یک زخم کوچک پاپولی فاقد ترشحات تا فرمهای با زخمهای وسیع، باد سرخی و فرمهای مزمن لوپوئید یا توبرکلوئید متغیر می باشد. تفاوت در فرم ضایعات ناشی از تفاوت در گونه انگل، ویرولانس متفاوت آنها و پاسخهای میزبان در مقابل انگل می باشد(۱).

بررسی قدرت تهاجمی انگل به ماکروفاژ در محیط آزمایشگاهی[۳] از روشهایی است که از آن جهت بررسی ویرولانس انگل استفاده می شود (۶-۴). با شناسایی گونه هایی از انگل با ویرولانس بالا می توان در هر منطقه از این گونه ایزوله ها در تهیه واکسن و همچنین بررسیهای دارویی استفاده نمود. این مطالعه با هدف بررسی ویرولانس انگلهای جدا شده از بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی با روش تهاجم ماکروفاژی در محیط آزمایشگاهی و به کارگیری ماکروفاژهای J ۷۷۴ انجام گردیده است.

**مواد و روش ها**

در این مطالعه تجربی از زخمهای بیماران مشکوک به لیشمانیوز جلدی مراجعه کننده به بخش انگل شناسی دانشکده پزشکی شیراز در سال ۱۳۸۳ نمونه گیری به عمل آمد. برای جدا سازی انگل، نمونه های به دست آمده تحت شرایط استریل به محیط دو فازی ان ان ان[۴] حاوی پنی سیلین (۲۵۰ واحد بر میلی لیتر) و استرپتومایسین (۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) برای کشت انگل منتقل گردید و پس از مدت سه روز به وسیله میکروسکوپ اینورت[۵] یا تهیه گسترش مستقیم مورد بررسی قرار گرفتند. در

1-Leishmania major
2-Leishmania tropica
3-In vitro
4-NNN
5-Invert

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

صورت مثبت بودن کشت رشد انگل، نگهداری آنها در محیط دو فازی تا زمانی که تعداد انگل به حدود ۲ میلیون در میلی لیتر برسد ادامه یافته و سپس جهت کشت انبوه به محیط آر پی ام آی[1] حاوی ۱۵-۱۰ درصد سرم جنین گوساله[2] منتقل گردیدند. محیط های کشت در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد جهت رشد انگل تا میزان مورد نیاز نگهداری شدند.

از تعداد ۲۰ نمونه تهیه شده از بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی که با روش مستقیم مثبت گزارش شدند ۶ نمونه به کشت انبوه رسیده و جهت آلوده کردن ماکروفاژها مورد استفاده قرار گرفتند.

در این مطالعه از رده سلول J ۷۷۴ ، ماکروفاژ موشی جهت بررسی قدرت تهاجم انگل لیشمانیا استفاده شده است. این سلولها از انستیتو رازی کرج (اهدایی دانشکده طب گرمسیری لیورپول) تهیه و در محیط آر پی ام آی حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گوساله ، ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر استرپتومایسین و ۱۰۰ واحد بر میلی لیتر پنی سیلین و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد حاوی ۵ درصد دی اکسید کربن تحت شرایط استریل کشت داده شدند.

برای آلوده کردن ماکروفاژها به وسیله انگل لیشمانیا، فرم متاسیکلیک انتخاب شد. جهت تهیه این فرم از انگل، درب فلاسکهای کشت حاوی انگل به وسیله پارافیلم محکم بسته شده و به مدت ۲ روز در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند تا شرایط لازم جهت تبدیل پروماستیگوتهای انگل به فاز متاسیکلیک مهیا گردد. پس از گذشت این مدت انگلها به فرم متاسیکلیک تبدیل شده و قادر به آلوده کردن ماکروفاژ خواهند بود. ماکروفاژهای کشت داده شده شمارش شده و غلظت $۵\times۱۰^{۶}$ از آنها تهیه گردید. انگلهای کشت داده شده نیز شمارش و سپس به ازای هر ماکروفاژ ۱۰ انگل به محیط کشت ماکروفاژها اضافه گردید. محیط کشت حاوی انگل و ماکروفاژ به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۲ درجه (حاوی دی اکسید کربن ۵ درصد) نگهداری سپس محیط روی محیط کشت تخلیه شده و سه مرتبه به وسیله آر پی ام آی به آرامی شستشو داده شدند (ماکروفاژها به ته فلاسک چسبیده اند و در اثر شستشو جدا نمی شوند) تا پروماستیگوتهای آزاد از محیط خارج شوند. سپس مقدار ۵ میلی لیتر محیط کشت جدید به فلاسکها اضافه شده و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۲ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. پس از این مدت مایع درون فلاسکها تخلیه شده و جهت بررسی درصد آلودگی ماکروفاژها از آنها لام تهیه گردید و پس از رنگ آمیزی با روش گیمسا مورد مطالعه قرار گرفتند. با شمارش صد ماکروفاژ درصد ماکروفاژهای آلوده و همچنین میانگین تعداد

1-RPMI
2-Fetal Calf Serum (FCS)

انگلهـای موجـود در هـر ماکروفـاژ مـشخص گردیـد. یافته های آزمایشگاهی به کمک نرم افـزار SPSS [1] و آمار توصیفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

**یافته ها**

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که قدرت تهاجم انگلهای مختلف جـدا شـده از بیمـاران متفـاوت می باشد. نمونـه شـماره ۱ سـبب آلـودگی ۵۹ درصـد ماکروفاژها شده و میانگین تعـداد انگـل در ماکروفـاژ ۶/۲۲ بـوده و بیـشترین تعـداد انگـل ۱۸ انگـل در یـک ماکروفـاژ بـوده اسـت. در نمونـه شـماره ۲، درصـد آلودگی ماکروفاژها ۱۰ درصد و میانگین آلـودگی ۳/۲ بوده است. نمونه شماره ۳ ، ۴۰ درصد ماکروفاژهـا را آلوده کرده که میانگین آلودگی ۲/۷۵ بوده است. نمونه شماره ۴ سبب آلودگی ۶۳ درصد ماکروفاژها شـده و میانگین حضور انگل در ماکروفاژهـا ۴/۲ بـوده اسـت. نمونه شماره ۵ ، ۶۶ درصد ماکروفاژها را آلوده کرده و میانگین حـضور انگـل ۴/۱۵ بـوده اسـت. در نمونـه شماره ۶، ۴۰ درصد ماکروفاژها آلوده شده و میانگین حـضور انگـل درون ماکروفاژهـا ۶/۲۷ بـوده اسـت. بیشترین تعداد انگل ۲۷ انگـل در یـک ماکروفـاژ بـوده اسـت. جـدول ۱ نتـایج حاصـل از آلـوده کـردن ماکروفاژهـا بـه وسـیله انگـل لیـشمانیا در محـیط آزمایشگاهی را نشان می دهد.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که میـان شکل ضایعات و قدرت تهـاجم انگلهـا بـه ماکروفاژهـا ارتبـاط وجـود دارد، بـه گونـه ای کـه انگلهـای بـا ویرولانس بالاتر قادر به ایجـاد ضـایعاتی بـا ظـاهری ملتهب و شکل باد سرخی می باشند. جدول ۲ ارتبـاط بین شکل ضایعه و شدت تهاجم انگلها به ماکروفـاژ را نشان می دهد. بررسی میـزان آلـودگی ماکروفاژهـا (قدرت تهاجم انگل) و محـل سـکونت افـراد نـشـان مـی دهـد کـه انگلهـای بـا ویـرولانس زیـاد در منـاطق مختلف اسـتان مـورد مطالعـه (فـارس) وجـود دارد و مختص یک منطقه خاص نمی باشـد. جـدول ۳ درصـد آلودگی ماکروفاژها به وسیله انگل را با توجه به محل سکونت افرادی که انگل از آنها جدا شـده اسـت نـشان می دهد.

**جدول ۱: نتایج حاصل از آلوده کردن ماکروفاژ موشی J۷۷۴ به وسیله انگل لیشمانیا در محیط آزمایشگاهی**

| شماره نمونه | درصد ماکروفاژهای آلوده | بیشترین تعداد انگل درون ماکروفاژ | میانگین تعداد انگل درون ماکروفاژ |
|---|---|---|---|
| ۱ | ۵۹ | ۱۸ | ۶/۲۲ |
| ۲ | ۱۰ | ۸ | ۳/۲ |
| ۳ | ۴۰ | ۸ | ۲/۷۵ |
| ۴ | ۶۳ | ۱۴ | ۴/۲ |
| ۵ | ۶۶ | ۲۰ | ۴/۱۵ |
| ۶ | ۴۰ | ۲۷ | ۶/۷۲ |

1- Statistical Package for Social Sciences

**جدول ۲: ارتباط بین شکل ضایعات پوستی بیماران و شدت تهاجم ماکروفاژی انگل لیشمانیا**

| شکل ضایعه | حداکثر حضور انگل در یک ماکروفاژ | درصد آلودگی ماکروفاژها |
|---|---|---|
| باد سرخی | ۱۸ | ۵۹ |
| باد سرخی | ۱۴ | ۶۳ |
| پاپول | ۸ | ۴۰ |
| مرطوب | ۸ | ۱۰ |
| مرطوب | ۲۰ | ۶۰ |
| مرطوب | ۲۷ | ۴۰ |

**جدول ۳: ارتباط میان میزان آلودگی ماکروفاژها به انگل لیشمانیا با محل سکونت بیماران**

| محل سکونت | درصد آلودگی ماکروفاژها |
|---|---|
| کوار- اکبرآباد | ۵۹ |
| شیراز | ۶۳ |
| تیون | ۴۰ |
| جهرم – قطب آباد | ۱۰ |
| خرامه | ۶۰ |
| نی ریز | ۴۰ |

## بحث و نتیجه گیری

لیشمانیوز جلدی در افراد آلوده دارای تظاهرات بالینی متفاوتی می باشد. شکل ضایعات در این بیماری می تواند به صورت پاپولی، زخمهای وسیع ملتهب و بادسرخی، زخمهای خشک و در بعضی موارد زخمهای مزمن توبرکلوئید باشد. این تنوع ضایعات و علایم بالینی ناشی از تفاوت در گونه انگل، ویرولانس انگل و پاسخ میزبان به انگل می باشد. انگلهای با ویرولانس زیاد قادرند سلولهای بیشتری از میزبان را آلوده نموده و با قدرت تکثیر زیاد در سلولها باعث انهدام تعداد زیادی از سلولهای میزبان، گسترش ضایعه و ایجاد زخمهای وسیع نمایند. شناسایی گونه های بیماری زای انگل می تواند در جهت شناسایی آنتی ژنهای بارز آنها جهت تهیه واکسن و همچنین مطالعات دارو درمانی مورد استفاده قرار گیرد (۸ و۷). استفاده از سلولهای ماکروفاژی J ۷۷۴ در مطالعات مختلف جهت بررسی قدرت آلوده کنندگی انگل و همچنین مطالعات مرتبط با بررسی دارویی مورد استفاده قرار گرفته است (۹ و۱). در مطالعه میر جلیلی و سرکاری (۲۰۰۵) از این رده سلولی جهت جداسازی سوشهایی از انگل با قدرت تهاجم زیاد استفاده شده است (۱۰). در مطالعه حاضر نیز از این رده سلولی جهت بررسی و مقایسه قدرت تهاجم انگلهای مختلف جدا شده از بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی استفاده شده است. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه ویرولانس انگلهای مختلف

جدا شده از بیماران مورد مطالعه متفاوت می باشد به گونه ای که قدرت آلوده کنندگی انگلها از ۱۰ تا ۶۳ درصد متغیر بوده است. از طرفی میان درصد آلودگی ماکروفاژی با میانگین حضور انگل در یک ماکروفاژ رابطه معنی داری وجود دارد به گونه ای که در مواردی که میانگین انگل درون ماکروفاژ بیشتر بوده درصد آلودگی ماکروفاژها نیز بیشتر بوده است. این یافته می تواند بیان کننده این باشد که افزایش سرعت تکثیر انگلها در ماکروفاژ سبب انهدام سریع آنها شده و در نتیجه سبب افزایش میزان آلودگی سایر ماکروفاژها شده است. نتایج حاصل از این مطالعه مشخص نمود که شکل ضایعه با میزان تهاجم انگل در محیط آزمایشگاهی مرتبط است و ضایعات منتشر عموماً در اثر ایزوله هایی ایجاد شده اند که دارای قدرت تهاجم بیشتری بوده اند هر چند عوامل میزبان نیز در این رابطه نقش خاص خود را دارند. بررسی قدرت تهاجم ماکروفاژی انگلهای جدا شده از بیماران از مناطق مختلف نشان دهنده این مطلب است که میان این عامل مورد مطالعه و محل سکونت رابطه معنی داری نیست و این بدان معناست که انگلهای با قدرت آلوده کنندگی زیاد مختص یک منطقه خاص نبوده و در سطح منطقه مورد مطالعه پراکنده می باشند.

بررسی مولکولی و بیوشیمیایی انگلهای با ویرولانس زیاد می تواند باعث شناسایی آنتی ژنهای مؤثر در این زمینه (۱۱) و همچنین شناسایی شاخص آنتی ژنیک مرتبط با این ویرولانس شود که این امر به نوبهٔ خود می تواند در تهیه واکسن مؤثر علیه این بیماری مورد استفاده قرار گیرد.

**تقدیر و تشکر**

از زحمات کارشناسان محترم بخش انگل شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز به خصوص پروانه حبیبی و سکینه کاظمیان تشکر می گردد .

# An in Vitro Study on Virulence of Leishmania Parasite Isolated from Cutaneous Leishmaniasis Patients

**Sarkari B** [*],
**Rezanejad H** [**],
**Hatam GHR** [***],
**Motazedian MH** [***],
**Mirjalili A** [****]

[*] Assistant Professor of Immunology, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj , Iran
[**] MSc in Parasitology, Shahid Beheshti Hospital, Shiraz, Iran
[***] Associate Professor of Parasitology, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
[****] Assistant Professor of Immunology, Biotechnology Department, Razi Vaccine and Serum Research Institute (RVSRI), Hesarrak, Karaj, Iran

**KEYWORDS:**
**Cutaneous leishmaniasis,**
**Virulence,**
**J774 macrophage**

Received: 2/5/1384
Accepted: 15/6/1384

**Corresponding author: Sarkari B**
**E mail:sarkarib@yahoo.com**

## ABSTRACT:

**Introduction & Objective:** Cutaneous Leishmaniasis (CL) is a parasitic disease caused by Leishmania parasites. Clinical manifestation of this disease ranges from a small papule to disseminated cutaneous lesion or chronic tuberculoid ulcer and is based on the type and virulence of parasite and also immune responses of the host. This study aimed to determine the virulence of Leishmania parasite isolated from cutaneous leishmaniasis patients.

**Materials & Methods:** Isolated parasites from CL patients were cultured. Macrophage cell line (J774) cultured in RPMI medium was used in this study to find out the virulence of isolated parasite. Cell line was infected by metacyclic form of parasite where parasite was added to the macrophage culture on a ratio of 10/1. Three days later, cell lines were checked for any infection and the rate of macrophage infectivity and mean of parasite number in each macrophage were calculated.

**Results:** Results of this study showed that virulence of isolated parasite was different where the rate of macrophage infection was 10-63%. Results also revealed that there was a correlation between the rate of macrophage infection and type of ulcers, where more invasive isolates induced ulcerative sores. No correlation was found between the rate of macrophage infection and place of resident of CL patients.

**Conclusion:** Isolated parasites from CL patients had different virulence and this might be the reason for various clinical signs in CL. Molecular and biochemical characterization of the most virulent isolates can be useful for vaccine development and also for drug related studies.

## REFERENSES:

۱. اردهالی ـ ص، رضایی ح، ندیم ا. انگل لیشمانیا و لیشمانیوز. چاپ دوم. تهران: مرکز نشر دانشگاهی؛ ۱۳۷۳؛ ٤۲ ـ ۲۷.

2.WHO. Report of working scientific group on leishmaniasis. 2-4 February 2004. Available from: http://www.who.int/tdr/publications/publications/pdf/swg_leish.pdf.

3.Motazedian H, Noamanpoor B, Ardehali S. Characterization of Leishmania parasites isolated from provinces of the Islamic Republic of Iran. East Mediterr Health J 2002;8(2-3): 338-344.

4.Chakraborty R, Chakraborty P, Basu MK. Macrophage mannosyl fucosyl receptor: its role in invasion of virulent and avirulent L. donovani promastigotes.Biosci Rep 1998;18(3):129-142.

5.Mendez S, Nell M, Alunda JM. Leishmania infantum: infection of macrophages in vitro with promastigotes. Int J Parasitol 1996; 26(6): 619-622.

6.Dey T, Afrin F, Anam K, Ali N. Infectivity and virulence of Leishmania donovani promastigotes: a role for media, source, and strain of parasite. J Eukaryot Microbiol 2002; 49(4): 270-274.

7.Sacks DL, Hieny S, Sher A. Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective developmental stages of Leishmania major promastigotes. J Immunol 1985; 135(1): 564-569.

8.Chakrabarty R, Mukherjee S, Lu HG, McGwire BS, Chang KP, Basu MK. Kinetics of entry of virulent and avirulent strains of Leishmania donovani into macrophages: a possible role of virulence molecules (gp63 and LPG). J Parasitol 1996; 82(4): 632-635.

9.Eslami Z, Tanner CE. Time course and intensity of infection in vitro in the resident peritoneal macrophages of resistant and susceptible mice exposed to different doses of Leishmania donovani promastigotes. Int J Parasitol 1994; 24(5): 743-7.

10.Mirjalili A, Sarkari B. Isolation of infective promastigotes of Leishmania major from long-term culture by cocultivation with macrophage cell-line. Biologicals 2005; 33: 257-260.

11.Rizvi FS, Afchain D, Sherlock I, Sadigursky M, Capron A, Santoro F. Infectivity of Leishmania promastigotes is associated with surface antigenic expression. Immunol Lett 1985; 11(5-6): 317-323.