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

تعیین هویت انگل‌های لیشمانیای جداشده از بیماران مبتلا به کالاآزار با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در استان کرمانشاه

مهدی فخار[1]؛ مسعود کیقبادی[2]*؛ رضا اکرمی‌پور[3]؛ کیقباد قدیری[3]؛ مجتبی لیمویی[4]

چکیده

زمینه: لیشمانیوز احشایی(کالاآزار)، بیماری انگلی مهمی است که توسط گونه‌های لیشمانیای دونوانی واینفانتوم ایجاد می‌شود. شواهد نشان می‌دهد که لیشمانیوز احشایی در بعضی از مناطق استان کرمانشاه وجود دارد. مطالعه حاضر با هدف بررسی خصوصیات عامل ایجادکننده لیشمانیوز احشایی در این استان انجام گرفته است.

روش‌ها: در این مطالعه تجربی از 9 بیمار مبتلا به کالاآزار بستری‌شده در بخش اطفال بیمارستان‌های کرمانشاه در سال‌های 88-1383 نمونه مغز استخوان تهیه گردید. از اسلایدهای میکروسکوپی، DNA استخراج و جهت تعیین گونه انگل با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز اختصاصی گونه مورد بررسی قرار گرفت. برای این کار با استفاده از پرایمر $LINR_4$ و LIN_{17} قطعه متغیر از حلقه‌های کوچک DNA کینوپلاستی انگل لیشمانیا تکثیر و بر روی ژل آگاروز 1/5 درصد الکتروفورز گردید.

یافته‌ها: تمامی بیماران به‌جز یک مورد از نظر سرولوژی با استفاده از آزمون ایمونوفلورسانس غیرمستقیم مثبت بودند. در بررسی اسمیرهای مستقیم مغز استخوان، اماستیگوت‌های انگل (اجسام لیشمن) به تعداد نسبتاً فراوان مشاهده شد. تمامی نمونه‌ها در آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، ایجاد باندی به اندازه 720 جفت باز نمود. مقایسه این باندها با باندهای گونه‌های استاندارد، مشخص نمود که گونه انگل در تمامی بیماران لیشمانیا اینفانتوم می‌باشد.

نتیجه‌گیری: تعیین گونه با استفاده از PCR یک‌مرحله‌ای و پرایمرهای $LINR_4$ و LIN_{17} مناسب است و همچنین عامل لیشمانیوز احشایی در کرمانشاه لیشمانیا اینفانتوم می‌باشد. بنابراین انجام مطالعه‌ای جامع در خصوص سرواپیدمیولوژی بیماری در انسان و مخازن حیوانی در استان ضروری است.

کلیدواژه‌ها: لیشمانیوز احشایی، کالاازار، لیشمانیا اینفانتوم، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

«دریافت: 1389/2/9 پذیرش: 1389/6/2»

1. گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
2. گروه انگل‌شناسی و قارچ شناسی، مرکز تحقیقات سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه
3. گروه اطفال، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه
4. گروه بهداشت عمومی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

* **عهده‌دار مکاتبات:** کرمانشاه، دانشکده بهداشت، مرکز تحقیقات سلامت دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، صندوق پستی: 671551797.
تلفن: 09123858799

Email: keighobadi_masoud@yahoo.com

مقدمه

لیشمانیازیس دربرگیرنده طیف وسیعی از بیماری‌ها از ضایعه جلدی تا لیشمانیوز احشایی کشنده می‌باشد که توسط گونه‌های مختلف انگل لیشمانیا ایجاد می‌شود. تظاهرات بالینی بیماری به سه فرم جلدی، جلدی مخاطی و احشایی قابل مشاهده است. لیشمانیوز احشایی، فرم سیستمیک بیماری است که کالاآزار نام دارد و توسط گونه‌های لیشمانیا دونوانی (Leishmania donovani) و اینفانتوم (Leishmania infantum) ایجاد می‌شود. لیشمانیوز احشایی در بیشتر مناطق ایران به‌صورت

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

اسپورادیک (تک‌گیر) و در مناطقی از استان‌های اردبیل (مشکین‌شهر و دشت مغان)، آذربایجان شرقی (اهر و کلیبر)، فارس (فیروزآباد، جهرم، نورآباد و داراب)، بوشهر (برازجان و خورموج) و قم (بخش خلجستان) به‌صورت آندمیک دیده می‌شود (1 و 2). مخازن بیماری، سگ و سگ‌سانان (روباه و شغال) و ناقلین آن را گونه‌های مختلف پشه خاکی تشکیل می‌دهند. این بیماری در ایران اغلب در کودکان زیر ده سال (98%) دیده می‌شود. بیشتر بین روستاییان شایع بوده و به‌طور کلی بیشترین موارد بیماری مربوط به عشایر استان‌های مختلف کشور می‌باشد. این بیماری طیف وسیعی از علایم را به‌دنبال خواهد داشت و از موارد بدون علامت تا موارد کشنده و حاد گزارش شده است و در بعضی از مناطق کشور، عفونت غیرآشکار بسیار شایع‌تر از بیماری بالینی است. همچنین مواردی از کالاآزار همراه با لیشمانیوز پوستی منتشر از جنوب ایران (استان فارس) گزارش شده که عامل آن لیشمانیا ترویپکا بوده است (1-4).

در مطالعه انجام‌شده به وسیله دکتر قینی و همکاران (1369-73) بر روی پرونده‌های بیمارستانی در بیمارستان‌های شهرستان کرمانشاه مشخص گردید که لیشمانیوز احشایی به‌طور اسپورادیک در مناطق مختلف استان کرمانشاه (از جمله شهرهای جوانرود، روانسر، دهلران و کرمانشاه) وجود دارد. در این مطالعه مشخص گردید که طی یک دوره پنج‌ساله (1369-73) تعداد 5 بیمار با تشخیص قطعی بیماری کالاآزار (مشاهده اجسام لیشمن در اسمیر مغز استخوان) در بخش اطفال بیمارستان‌های شهرستان کرمانشاه بستری شده‌اند. بیشترین موارد بیماری در شهر جوانرود و موارد بعدی از مناطق کرمانشاه، روانسر و دهلران بوده است (5).

به‌طورکلی یکی از اصول مهم در کنترل و پیشگیری بیماری لیشمانیوز، شناسایی و تعیین مشخصات گونه‌های مختلف ایجادکننده آن است. از سوی دیگر، تعیین سوش غالب در یک منطقه می‌تواند در مطالعات دارویی، تهیه واکسن و تهیه آنتی‌ژن مناسب به‌منظور تشخیص بیماری کاربرد داشته باشد. به‌طور کلی تعیین هویت انگل‌های مولد لیشمانیوز احشایی از اهمیت خاصی برخوردار است چرا که از یک‌طرف با افزایش موارد ابتلا به بیماری ایدز در کشورهای جهان سوم و در حال توسعه، الگوی بالینی بیماری پیچیده‌تر شده است و از طرف دیگر گزارش‌های متعددی از پتانسیل ایجاد عفونت احشایی به‌وسیله سوش‌های انگل لیشمانیا ترویپکا در انسان از نقاط مختلف دنیا از جمله از سربازان آمریکایی در جنگ خلیج فارس و استان فارس باعث ایجاد نگرانی‌هایی در خصوص اپیدمیولوژی این بیماری شده است (4، 8 و 9).

تاکنون مطالعه‌ای که تعیین‌کننده عوامل مولد لیشمانیوز احشایی در استان کرمانشاه باشد صورت نگرفته است. در مطالعه حاضر برای اولین‌بار انگل‌های لیشمانیای جدا شده از بیماران مبتلا به لیشمانیوز احشایی در استان کرمانشاه به‌کمک روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تعیین هویت شده است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، 9 بیمار مبتلا به کالاآزار مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های امام رضا و رازی در سال‌های 88-1383، ابتدا به‌وسیله پزشک متخصص کودکان و فوق‌تخصص خون از نظر معاینات بالینی مورد بررسی قرار گرفتند و پس از مشکوک شدن به این بیماری، سونوگرافی شکم، آزمایش‌های شمارش کامل سلول‌های خونی (Cell Blood Count (CBC))، ادرار و سرولوژی به‌منظور رد یا تأیید بیماری درخواست شد. همچنین جهت تأیید نهایی، آسپیراسیون مغز استخوان نیز درخواست گردید. اسمیرهای مستقیم مغز استخوان پس از ثابت نمودن با الکل متیلیک، با رنگ گیمسا رنگ‌آمیزی گردید.

از میان 9 بیمار مورد مطالعه، 5 بیمار مذکر و 4 بیمار دیگر مؤنث و میانگین سنی آن‌ها 2/5 سال بود. این بیماران ساکن روستاهای مختلف استان از جمله شهر

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

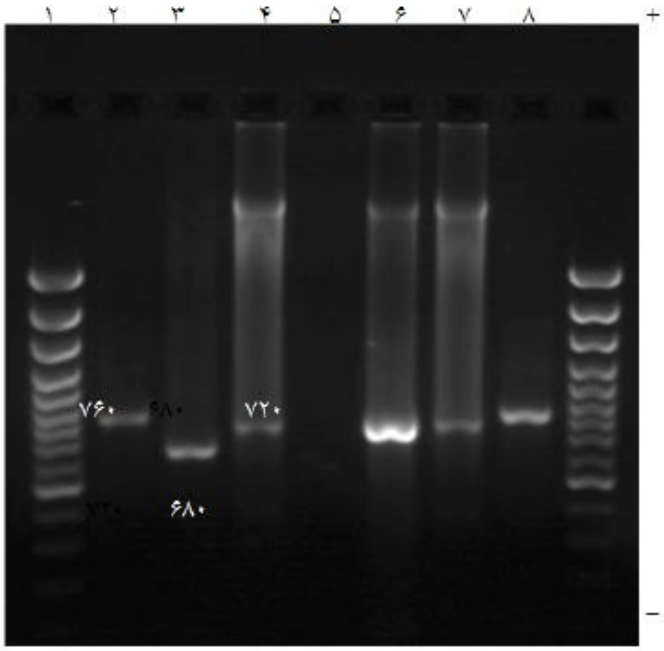
جوانرود روستای (کلاش لولم)، روانسر، سرپل‌ذهاب و کرمانشاه بودند.

برای استخراج DNA از اسلایدهای رنگ‌آمیزی‌شده مغز استخوان مربوط به بیماران مبتلا به کالاآزار استفاده شد. برای تعیین گونه انگل در بیماران مذکور، از روش وینسی (Vince) و همکاران استفاده گردید (6). سپس DNA استخراج‌شده، جهت آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز اختصاصی گونه مورد استفاده قرار گرفت. بدین‌منظور با استفاده از پرایمر $LINR_4$ و LIN_{17} قطعه متغیر از حلقه‌های کوچک DNA (Minicircles) کینوپلاستی انگل لیشمانیا در یک مرحله تکثیر داده شد (7). مواد لازم برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای نمونه‌ای به حجم 25 میکرولیتر به این قرار بود: Taq DNA پلی‌مراز (سیناژن ایران) یک واحد، بازهای دی‌اکسی نوکلئوتید 2/5 میلی‌مول، کلرید منیزیم 2 میلی‌مول، بافر واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (سیناژن–ایران) 2/5 میکرولیتر، نانوگرم از پرایمرهای $LINR_4$(GGGGTTGGTGTAAAATAGGG-3) و LIN_{17}(5-TTTGAACGGGATTTCTG-3) به این مجموعه 5 میکرولیتر از DNA مورد نظر اضافه شد. سپس نمونه‌های آماده‌شده در دستگاه ترموسایکلر (تیچن و کمبریج (Techen & Cambridge) ساخت انگلستان) با برنامه ذیل قرار داده شدند: در مرحله اول، دمای 94 درجه سانتی‌گراد به‌مدت 5 دقیقه در یک مرحله، در مرحله دوم، 1- دمای 94 درجه به‌مدت 30 ثانیه، 2- دمای 52 درجه به‌مدت 30 ثانیه و 3- دمای 72 درجه به مدت 1 دقیقه که مرحله دوم، 30 بار تکرار گردید. در مرحله سوم، دمای 72 درجه سانتی‌گراد به‌مدت 5 دقیقه در یک مرحله انجام گرفت. پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، محصول به‌دست‌آمده بر روی ژل آگاروز 1/5 درصد الکتروفورز شده و با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی گردید. سپس بر روی دستگاه ترانس ایلومیناتور قرار داده شده و از ژل حاوی باندها عکسبرداری گردید و با توجه به شاخص وزنی، گونه انگل مشخص شد.

یافته‌ها

علایم بالینی مشاهده‌شده در این بیماران بیشتر شامل هپاتواسپلنومگالی و تب طولانی‌مدت بود. عمده‌ترین شکایت بیماران، درد شکم، تب بالا و کاهش اشتها بوده است. آزمایش‌های خون‌شناسی نشان‌دهنده کم‌خونی، ترومبوسیتوپنی، لکوپنی، هیپرگاماگلوبولینمی، هیپوآلبومینمی (برعکس شدن نسبت آلبومین به گلوبولین سرم) و طبیعی بودن آزمون‌های عملکرد کبد (Liver Function Test (LFT)-) بود. در آزمایش‌های سرولوژی بیماران از آزمون ایمونوفلورسانس غیرمستقیم (Immunofluorescent Antibody Test) استفاده شد. در این آزمون، تیترآنتی‌بادی 1:128 و بالاتر به‌عنوان تیتر مثبت در نظر گرفته می‌شود. در مطالعه حاضر تمامی بیماران دارای عیار آنتی‌بادی ضد لیشمانیایی احشایی برابر 1:128 و بالاتر بودند، به همین دلیل بیماران بجز یک مورد که بیمار مبتلا به سندروم فانکونی نیز بود، از نظر سرولوژی مثبت بودند. با بررسی اسمیرهای مستقیم مغز استخوان، اماستیگوت‌های انگل (اجسام لیشمن) به تعداد نسبتاً فراوان مشاهده شد.

0bp برای تعیین گونه انگل در روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز باند حاصل برای لیشمانیا اینفانتوم 720 جفت باز، لیشمانیا تروپیکا 760 جفت باز و برای لیشمانیا ماژور650 جفت باز می‌باشد. تمامی نمونه‌های جداشده از بیماران کالاآزاری مورد مطالعه در آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز باند 720 جفت باز ایجاد نمودند. مقایسه باندهای حاصل از نمونه‌های جداشده این بیماران با گونه‌های استاندارد، نشان داد که گونه انگل مولد لیشمانیوز احشایی در تمامی بیماران مورد مطالعه، لیشمانیا اینفانتوم می‌باشد (تصویر1).



تصویر1- نتیجه الکتروفورز محصولات PCR اختصاصی نمونه‌های مغز استخوان با پرایمرهای LIN_{17} و $LINR_4$ در ژل آگاروز **1/5** درصد

1- مارکر bp **100** **2-** L.t استاندارد **3-** L.m استاندارد **4-** L.i استاندارد

5- کنترل منفی **6-** L.i (مغز استخوان) **7-** L.i (مغز استخوان) **8-** L.t استاندارد

بحث

در مطالعه حاضر مشخصات عامل مولد بیماری کالاآزار در استان کرمانشاه برای اولین‌بار به‌کمک روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تعیین گردید. جهت تعیین گونه انگل‌های لیشمانیا، روش‌های مختلف مولکولی و بیوشیمیایی به‌کار گرفته شده‌اند که در این بین، روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به‌دلیل آن‌که مستقیماً بر ژنوم انگل تأکید دارد و امروزه طبقه‌بندی موجودات مختلف بر پایه خصوصیات ژنتیک آن‌ها تعریف می‌شود، دارای ارزش ویژه‌ای است. از مزایای انجام روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در تشخیص کالاآزار می‌توان به تشخیص زودرس، حساسیت و ویژگی بالا، عدم نیاز به کشت انگل و استفاده از اسلایدهای بایگانی‌شده بیماران و به‌طور کلی انجام آن بر روی نمونه‌های بالینی به‌طور مستقیم اشاره نمود **(10)**. تاکنون روش‌های واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به‌کار گرفته‌شده، انواع مختلفی از DNA لیشمانیایی را جهت تکثیر مورد هدف قرار داده‌اند. اما براساس تحقیقات انجام‌شده به‌نظر می‌رسد از بهترین این اهداف که می‌تواند بیشترین حساسیت و ویژگی را فراهم نماید تکثیر حلقه‌های کوچک DNA کینتوپلاستی لیشمانیا باشد. از حلقه‌های کوچک در هر سلول انگل لیشمانیا تعداد فراوانی کپی **(10** هزار کپی**)** موجود بوده و طول متوسط هر یک بین **700-1000** جفت نوکلئوتید است. هر حلقه کوچک از دو قطعه ثابت و متغیر تشکیل یافته که سکانس قطعه ثابت در گونه‌های مختلف لیشمانیا یکسان است، لذا از تکثیر آن جهت تشخیص جنس لیشمانیا استفاده می‌شود، اما سکانس و طول قطعه متغیر در انواع گونه‌های انگل لیشمانیا متفاوت بوده لذا با تکثیر این قطعه و بر اساس تفاوت وزن باندهای حاصل می‌توان گونه‌های مختلف را جداسازی نمود. پرایمرهای $LINR_4$ و LIN_{17} به‌کار رفته در این تحقیق، تأمین‌کننده چنین هدفی بود **(10-13)**. پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه **(**$LINR_4$ و **LIN17)**، از روش Aranssay و همکاران **(7)** اقتباس شد. البته این‌پژوهشگران روشSemi-nested PCR

را که یک روش PCR دومرحله‌ای است معرفی کرده‌اند. در مطالعه ما، جهت رفع اشکالات در روش‌های PCR دو مرحله‌ای (7) از قبیل وقت‌گیر بودن، دشواری در اجرا به‌ویژه در بررسی‌های اپیدمیولوژیک و تشخیص بیماری با استفاده از نمونه‌های بالینی دارای عوامل مخدوش‌کننده بیشتر روش PCR یک‌مرحله‌ای طراحی شده و مورد بررسی قرار گرفت. این روش علاوه بر قابلیت تعیین گونه انگل، از سهولت نسبی و حساسیت و ویژگی مناسب نیز برخوردار است.

نتایج مطالعه حاضر روشن نمود که عامل مولد بیماری کالاآزار در استان کرمانشاه لیشمانیا اینفانتوم می‌باشد. در مطالعه مشابه انجام‌شده در استان کهکیلویه و بویراحمد بر روی 6 بیمار مبتلا به کالاآزار بستری‌شده در بیمارستان کودکان یاسوج، عامل مولد لیشمانیوز احشایی، لیشمانیا اینفانتوم گزارش شد (14). در مطالعه مظلومی و همکاران در شمال غرب ایران از 21 نمونه جداشده از بیماران مبتلا به کالاآزار، انگل مورد نظر در تمامی موارد، لیشمانیا اینفانتوم گزارش گردید (15). در مطالعه محبعلی و همکاران (2005) در مناطق آندمیک ایران، لیشمانیا اینفانتوم از سگ و شغال (مخازن کالاآزار) جدا گردید (2). در مطالعه فخار و همکاران (2008) بر روی اسلایدهای آسپیراسیون مغز استخوان تهیه شده از مناطق مختلف استان فارس، با روش‌های Semi-Nested PCR، species-specific PCR و Microsatellite گونه اصلی بیماری لیشمانیا اینفانتوم و عامل دوم سوش احشاء دوست لیشمانیاتروپیکا گزارش گردید (16 و 17). عامل اصلی بیماری کالاآزار در کشورهای حوزه وسیع مدیترانه، لیشمانیا اینفانتوم گزارش شده است (18). مطالعه ما با سایر مطالعات انجام‌شده در ایران و کشورهای حوزه مدیترانه همخوانی دارد. لازم به ذکراست که پژوهش مشابه مطالعه حاضر که بر روی اسلایدهای مغز استخوان انجام شده باشد در سایر کشورهای مدیترانه‌ای یافت نشد.

نتیجه‌گیری

در مجموع، نتایج این مطالعه برای اولین‌بار مشخص نمود که عامل مولد کالاآزار در استان کرمانشاه، لیشمانیا اینفانتوم است. روند رو به رشد کالاآزار و استقرار عشایر در بعضی از نواحی استان کرمانشاه، حاکی از نوپدیدی بیماری در این استان است. از عوامل احتمالی مرتبط با نوپدیدی بیماری در استان می‌توان به کوچ عشایر به استان‌های مجاور زاگرس، افزایش آگاهی پزشکان، در دسترس قرار گرفتن تست‌های تشخیصی، تغییرات آب و هوایی و ضعف سیستم ایمنی اشاره نمود. در پایان پیشنهاد می‌گردد مطالعات جامع در خصوص جنبه‌های مختلف لیشمانیوز احشایی(از جمله مخازن و ناقلین) در استان کرمانشاه انجام گیرد. همچنین کارگاه‌های آموزشی برای پزشکان و کارکنان بهداشتی و درمانی توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از دکتر منصوری معاونت وقت بهداشتی استان، مهندس اردلان، جناب آقای قاضی‌زاده و به‌خصوص همکاری بسیار خوب مرکز بهداشت و واحد بیماری‌های جوانرود و بهورز کلاش لولم به‌خاطر همکاری در انجام این طرح، کمال تشکر و قدردانی داریم.

References

1. Fakhar M, Motazedian MH, Asgari Q, Mohebali M, Mehrabani D. [A new endemic focus of visceral Leishmaniosis in Southern Iran (Persian)]. Armaghane-Danesh 2006; 11(2): 104-10.
2. Mohebali M, Hajjaran H, Hamzavi Y, Mobedi I, Arshi S, Zarei Z, et al. Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniosis in the Islamic Republic of Iran. Vet Parasitol 2005; 129(3-4): 243-51.
3. Asgari Q, Fakhar M, Motazedian MH. Nomadic Kala-azar in South of Iran. Iranian J Public Health 2006: 35(3): 85-86.

4. Alborzi A, Pouladfar GR, Fakhar M, Motazedian MH, Hatam GR, Kadivar MR. Isolation of Leishmania tropica from a patient with visceral leishmaniasis and disseminated cutaneous leishmaniasis, Southern Iran. Am J Trop Med Hyg 2008; 79(3): 435-7.
5. Shobeiri R. [Study on patients infected to kala-azar in Kermanshah town (Persian)]. MD thesis. Kermanshah: School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences 1993-1994.
6. Vince A, Poljak M, Seme K. DNA extraction from archival Giemsa-stained bone marrow slides: Comparison of six rapid methods. Br J Heamatol 1998; 101(2): 349-531.
7. Aransay AM, Scoulica E, Tselentis Y. Detection and identification of Leishmania DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. Appl Environ Microbiol 2000; 66(5): 1933-8.
8. Magill AJ, Gr?gl M, Gasser RA Jr, Sun W, Oster CN. Visceral infection caused by Leishmania tropica in veterans of Operation Desert Storm. N Engl J Med 1993; 328(19): 1383-7.
9. Geramizadeh B, Fakhar M, Motazedian MH. Visceral leishmaniasis with duodenal involvement: three immunocompetent cases from Southern Iran. Ann Trop Med Parasitol 2006; 100(7): 637-40.
10. Noyes HA, Reyburn H, Bailey JW, Smith D. A Nested PCR-based schizodeme method for identifying Leishmania kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of epidemiology of Leishmania tropica in Pakistan. J Clin Microbiol 1998; 36(10): 2877-88.
11. Lauchaud L, Chabbert E, Dubessay P, Oreynes J, Lamothe J, Bastien P. Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood. J Clin Microbiol 2001; 39(2): 613-7.
12. Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of Leishmania. Exp Parasitol 1990; 71(3): 267-75.
13. Motazedian MH, Karamian M, Noyes HA, Ardehali S. DNA extraction and amplification of Leishmania from archived, Giemsa-stained slides, for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis by PCR. Ann Trop Med Parasitol 2002; 96(1): 31-4.
14. Sarkari B, Fakhar M, Hatam GhR , Motazedian MH, Ebrahimi S, Kalantari M, et al. [Characterization of Leishmania parasites isolated from Kala- azar patients in Kohgiloyeh and BoyerAhmad, using semi-nested PCR (Persian)] Armaghane-Danesh 2006; 11(1): 27-32.
15. Mazloumi Gavgani AS, Esmaeli H, Davies CR. [Species and strain identification of the Leishmania isolated from Kala-azar patients in North West of Iran (Persian)]. J Uromia Univers Med Scienc 2004; 15 (1): 39-46.
16. Fakhar M, Motazedian MH, Daly D, Lowe C, Noyes HA. [An integrated pipeline for the development of novel panels of mapped microsatellite markers for Leishmania donovani complex, Leishmania braziliensis and Leishmania major]. Parasitology 2008; 135(5): 567-74.
17. Fakhar M, Motazedian MH, Hatam GR, Asgari Q, Kalantari M, Mohebali M. Asymptomatic human carriers of Leishmania infantum: possible reservoirs for Mediterranean visceral leishmaniasis in southern Iran. Ann Trop Med & Parasitol 2008; 102(7): 577-83.
18. World Health Organization. The leishmaniasis. Technical report 1990; 793: 27.