● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ چهاردهم، شمارهٔ ۲، ص ۱۳۹-۱۳۴، ۱۳۸۶

مقالهٔ پژوهشی

تعیین مخازن و ناقلین لیشمانیوز جلدی به روش مولکولی Nested-PCR در روستاهای شهرستان مرودشت، استان فارس

دکتر یاور رائی[*1]، مهندس مسعود محمدقاسمی[2]، دکترعزت‌الدین جوادیان[3]، دکترحسین معتضدیان[4]، مهندس سینا رفیع‌زاده[5]، مهندس عباس آقایی‌افشار[6]، دکتر جواد رفیع‌نژاد[7] و مهندس مجید جلالی[8]

خلاصه

مقدمه: لیشمانیوز جلدی یک معضل مهم بهداشتی در بسیاری از مناطق ایران به شمار می‌رود . میزان بروز این بیماری طی دهه اخیر در جنوب ایران دو برابر شده است. بنابراین برای تعیین مخازن و ناقلین لیشمانیوز جلدی در مناطق روستایی شهرستان مرودشت استان فارس، این مطالعه اپیدمیولوژیکی طی سال‌های ۱۳۸۲ و ۱۳۸۳ انجام گرفت.

روش: در این بررسی جمعاً ۱۲۶ سر جونده از سه روستای انتخابی با استفاده از تله‌های زنده‌گیر صید شدند و بعد از تهیه اسمیر و رنگ‌آمیزی با گیمسا از نظر وجود اجسام لیشمن مورد بررسی قرار گرفتند. پس از استخراج DNA از اسمیرهای مثبت از روش Nested-PCR برای تعیین گونه انگل استفاده شد. همچنین ۲۰۰ عدد پشه خاکی با استفاده از آسپیراتور صید و جمع‌آوری شد و پس از تعیین گونه، استخراج DNA و PCR صورت گرفت.

یافته‌ها: حیوانات صید شده شامل گونه‌های *Meriones libycus* (۷۵/۴٪)، *Cricetulus migratorius* (۱۴/۳٪) و *Microtus arualis* (۱۰/۳٪) بودند. نتایج Nested-PCR نشان داد که ۸/۴ درصد از جوندگان *M.libycus* آلوده به انگل *Leishmania major* می‌باشند. در بین پشه خاکی‌های جمع‌آوری شده، ۷۵٪ آنها گونه *Phlebotomus papatasi* بوده که ۲/۷٪ آنها آلوده به لیشمانیا ماژور بودند.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج بدست آمده از PCR در حدود ۲/۷ درصد گونه *P.papatasi* به طور طبیعی آلوده به انگل *L.major* بودند. این اولین گزارش در مورد اثبات گونه *P.papatasi* به عنوان ناقل اصلی لیشمانیوز جلدی به روش مولکولی در استان فارس می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: مخزن، ناقل، لیشمانیوز جلدی، Nested-PCR، فارس، ایران

۱- دانشیار حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران ۲- کارشناس ارشد حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران و ایستگاه تحقیقات بهداشتی کازرون – شیراز ۳- استاد حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران ۴- دانشیار انگل‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز ۵- کارشناس ارشد ژنتیک انسانی، اداره ژنتیک، مرکز مدیریت بیماری‌های تهران ۶- کارشناس ارشد حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۷- استادیار حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران ۸- کارشناس ارشد حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی کازرون – شیراز

* **نویسنده مسؤول:** گروه حشره‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران ● **آدرس پست الکترونیک:** rassiy@sina.tums.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۴/۱۹ **دریافت مقاله اصلاح شده:** ۱۳۸۵/۱۱/۳۰ **پذیرش مقاله:** ۱۳۸۵/۱۲/۲۳

مقدمه

در حال حاضر کانون‌های بسیاری از لیشمانیوز جلدی روستایی در استان فارس وجود دارد (۱۲،۱۳،۱۴). این کانون‌ها در سال‌های گذشته محدود به مناطق خاصی بوده ولی افزایش جمعیت، گسترش شهرها، احداث مناطق مسکونی در نزدیک کلنی جوندگان (مخازن بیماری) و ایجاد شهرک‌ها باعث دگرگونی وضعیت این بیماری در کشور و از جمله استان فارس شده است. امروزه در استان فارس، شهرستان‌های ارسنجان، نی‌ریز و همچنین مرودشت با این معضل بهداشتی مواجه بوده، به طوری که در شهرستان مرودشت در سال ۱۳۷۹ تعداد موارد جدید ۴۶۵ نفر بوده و در سال ۱۳۸۰ با ۲۳/۸ درصد افزایش به ۵۶۷ نفر رسیده است (مکاتبه شخصی). در دیگر کانون‌های ایران مانند مناطق مرکزی ایران (اصفهان) جونده *Rhombomys opimus* و در غرب و جنوب غربی کشور *Tatera indica* مخازن اصلی بیماری هستند و *Meriones libycus* نقش ثانویه را از نظر حفظ و نگهداری بیماری دارد (۶،۷،۹) و این در حالی است که در مناطق روستایی ارسنجان و نیریز استان فارس جونده *Meriones libycus* نقش اصلی و قطعی مخزن بیماری را ایفاء می‌کند (۱۲،۱۳،۱۴). در اغلب کانون‌های لیشمانیوز جلدی روستایی در ایران، مانند کانون هیپراندمیک اصفهان پشه خاکی *P.papatasi* به عنوان ناقل اصلی بیماری گزارش شده است (۱۱،۱۶). از این گونه به همراه *P.caucasicus* برای اولین بار در ایران به روش ایزوآنزیم عامل بیماری *L.major* (zymodeme MON.26) جداسازی و تعیین هویت شده است (۱۷). لازم به توضیح است این روش علی‌رغم دقت بیشتر آن، دارای معایب متعددی می‌باشد که از آن جمله می‌توان نیازمندی به کشت تعداد زیاد انگل و آلودگی ایزوله‌های اولیه انگل را نام برد (۱۱). در حال حاضر روش‌های مولکولی این امکان را می‌دهد که گونه انگل لیشمانیا را با تعداد کم در نمونه‌های اولیه تعیین هویت کرد (۱).

بر این اساس، با توجه به بررسی‌های انجام شده در مطالعه حاضر برای تعیین هویت گونه انگل لیشمانیا در مخازن و ناقلین لیشمانیوز جلدی از روش Nested-PCR استفاده شده است. این پژوهش اولین تحقیق جهت تعیین ناقل قطعی ZCL به روش فوق‌الذکر در استان فارس می‌باشد.

روش بررسی

منطقه مورد مطالعه

این بررسی در سه روستای رجاءآباد، قربانلک، و سلطان ولایت از بخش محمدآباد شهرستان مرودشت (۵۲ درجه و ۵۶ دقیقه شرقی و ۲۹ درجه و ۵۴ دقیقه شمالی واقع در ۱۱ کیلومتری شهرستان مرودشت) انجام گرفت. ارتفاع این شهرستان ۱۵۹۵ متر از سطح دریا می‌باشد. در این منطقه هوا در طول تابستان گرم بوده (حداکثر ۴۰ درجه سانتی‌گراد) و در زمستان سرد می‌باشد. اغلب مردم در روستاهای این شهرستان به شغل کشاورزی و دامداری مشغول هستند.

جمع‌آوری جوندگان و تهیه اسمیر از آنها

تعداد ۱۲۶ جونده طی ماه‌های پاییز سال ۱۳۸۲ و بهار و تابستان سال ۱۳۸۳ با استفاده از تله های زنده‌گیر جمع‌آوری شدند. هر ماه یک بار و هر دفعه ۲۰ عدد تله در نزدیکی لانه‌های فعال جوندگان نصب می‌شد. در این تله‌ها از خیار، گوجه فرنگی و گردوی بو داده به عنوان طعمه استفاده می‌شد. تله‌ها در دو نوبت صبح و عصر به کار گرفته می‌شدند.

جوندگان جمع‌آوری شده جهت تهیه اسمیر به آزمایشگاه ایستگاه تحقیقات بهداشتی کازرون منتقل می‌شدند. پس از معاینه حیوانات، نمونه‌ها از موارد مشکوک اسمیر از ناحیه گوش و یا زخم‌های مشکوک روی پوست تهیه و پس از رنگ‌آمیزی با گیمسا زیر میکروسکوپ نوری برای وجود اجسام لیشمن مورد بررسی قرار می‌گرفت.

در این مطالعه دو اسمیر مشابه از دو بیمار شامل یک دختر ۵ ساله از روستای قربانلک و یک پسر ۱۵ ساله از روستای رجاءآباد تهیه گردید. برای شناسایی جوندگان از کلید اعتماد استفاده شد (۴).

تعیین گونه انگل از اسمیرهای مثبت

پس از استخراج DNA از اسمیرهای مثبت آماستیگوت موجود در روی لام‌ها (۲،۸)، برای تعیین گونه انگل از روش Nested-PCR استفاده شد (۱۰). پرایمرهای استفاده شده شامل CSB1XR (GA CCC ACT GCA GAA GTA CGA) و CSB2XF (GTT AGA CGC TTT GAT CGC TTT ATT)

ACG) بـــرای رونـــد اول و LiR (GCC AAC CAG TCG CCT) و 13Z(G TGT GGT GGG ACT TGG AAA ATA) برای دور دوم بودند. پرایمرهای اسـتفاده شـده از شـرکت کالای طب شیراز تهیه شد.

سوش‌هـای مرجـع *Lmajor* (MHOM/IR/XX/LV 114) و *L.tropica* (MHOM/IR/89/ARD22) به عنوان استاندارد انتخاب شد. این سوش‌ها از دانشکده بهداشت و انسـتیتو تحقیقـات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه گردید.

جمع‌آوری پشه خاکی‌ها

پشه خاکی‌ها هر دو هفته یک بار در ماه‌هـای مـرداد و شهریور سال ۱۳۸۳ از اماکن داخلـی شـامل اتـاق خـواب، توالت و اصطبل‌ها در روستاهای ذکـر شـده بـا اسـتفاده از آسپیراتور جمع‌آوری شدند.

در هر روستا به طور معمول سه مکان انتخاب و یک یـا دو ساعت بعد از غروب آفتاب به مدت یک ساعت اقدام به جمع‌آوری پشه خاکی‌ها می‌شد. بیشترین و کمترین درجـه حرارت و رطوبت محیط ثبت می‌شد. پشه خاکی‌های صـید شده به آزمایشگاه منتقل شده و پس از قطع سـر و انتهـای بدن هر پشه خاکی، با استفاده از کلید معتبـر تعیـین گونـه می‌شد (۱۵).

باقی‌مانده پشه خاکی که شامل سینه و قسمت اعظم شکم بود به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری حاوی الکل ۹۵ درجه منتقل شده و برای استخراج DNA و انجام PCR آماده می‌گردید. به لام تهیه شده و میکروتیوب برچسب مشابه اختصاص داده می‌شد.

استخراج DNA و انجام PCR

استخراج DNA از پشه خاکی‌ها برای انگل *Lmajor* بـه روش Collins انجام گرفت (۲) و برای PCR از روش Noyes با پرایمرهای ذکر شده استفاده گردید (۱۰).

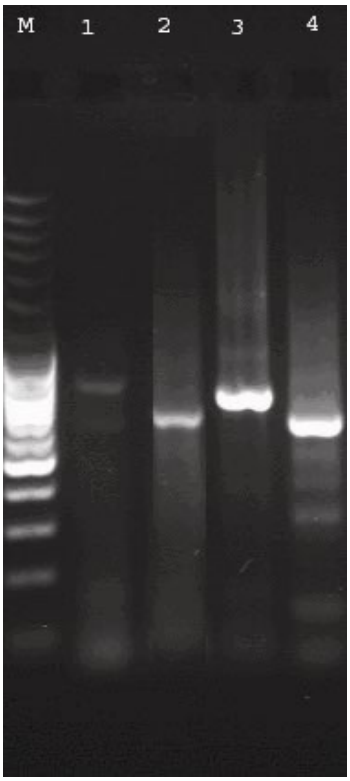
نتایج

پشه خاکی‌ها

مجموعاً ۲۰۰ عدد پشه خاکی صید شد. گونه‌های صـید شـــده شـــامل *P. papatasi* (۷۵٪)، *P.sergenti* (۱۵٪) و *P.caucasicus* (۱۰٪) بودند. در بین پشه خـاکی‌هـای صـید شده ۴ عدد فلبوتوموس پاپاتاسـی (۲/۷ درصـد) بـه طـور طبیعی آلوده به *Lmajor* مشاهده گردیـد (تصـویر ۱). ایـن اولین گزارش در مورد ردیابی انگل به طور مستقیم در گونه *P.papatasi* ناقل اصلی و قطعی عامـل بیمـاری *Lmajor* بـه انسان می‌باشد. بررسی‌های اکولوژیکی روی این گونه نشان داد که این پشه خاکی فعالیت خود را در اوایل بهار شـروع کرده و با یک اوج فعالیت در مرداد مـاه در اواسـط پـاییز خاتمه می‌دهد.

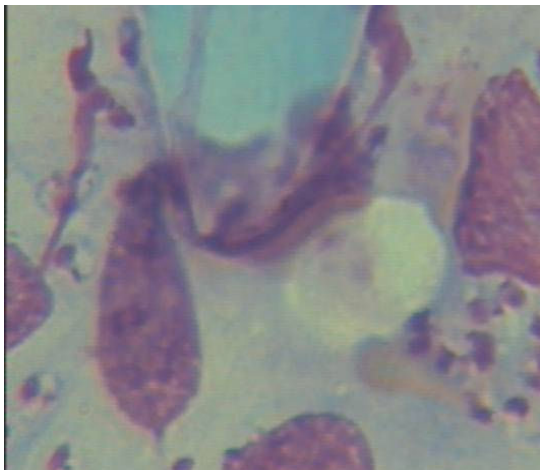
جوندگان

در این مطالعه جمعاً ۱۲۶ جونده صید شدند. اگرچه بـین جوندگان جمع‌آوری شده ۱۳ سر گونه *Microtus arualius* و ۱۸ سر گونه *Cricetulus migratorius* صید شدند ولی فقـط در ۸ سر از جونده‌های *M. libycus* (۸/۴٪) اجسام لیشمن مشاهده شد.

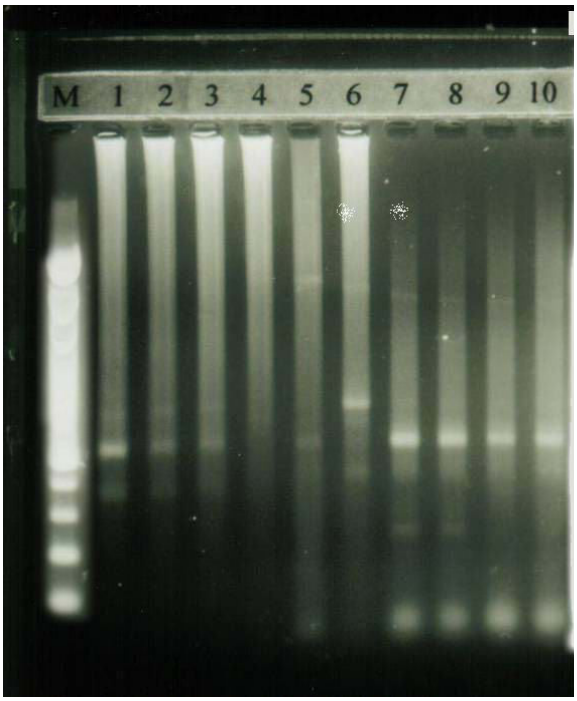


تصویر ۱: *نتایج Nested-PCR بر روی P.papatasi*

لاین ۱ و ۲ مربوط بـه سـوش‌هـای بـه ترتیـب *L. tropica* و *Lmajor* استاندارد ، لاین M مربوط به مارکر، لاین ۴ مربـوط بـه *P.papatasi* آلـوده و لاین ۳ مربوط به *l.infantum* استاندارد می‌باشد.



تصویر ۲: *آماستیگوت‌های Lmajor از اسمیر گوش جونده Meriones libycus که با گیمسا رنگ آمیزی شده است.*



تصویر ۳: *نتایج Nested-PCR بر روی M.libycus و نمونه‌های انسانی*

لاین M مربوط به مارکر، لاین۱ و ۶ مربوط به سوش‌های به ترتیب *Lmajor* و *Ltropica* مرجع، لاین‌های ۲–۳ و ۵ از اسمیر زخم یک انسان مبتلا به *Lmajor*، لاین۴ از اسمیر زخم یک انسان غیر از سالک، لاین‌های ۷، ۸، ۹ و ۱۰ از اسمیر گوش جونده *M.libycus* آلوده به *Lmajor*

هر موش آلوده حداقل دارای یک زخم در گوش و یا قاعده دم بود. آماستیگوت‌های مشاهده شده در جوندگان آلوده مشابه هم بود (تصویر ۲).

آلودگی انگلی در بین جانوران نر و ماده هر دو مشاهده گردید. در منطقه مورد مطالعه گونه *M. libycus* فعالیت روزانه داشته است. جمعاً ۲۶ اسمیر گرفته شده از جوندگان و ۲ اسمیر از اهالی منطقه مورد مطالعه، همگی به انگل لیشمانیا ماژور آلوده بودند. برای مقایسه انگل جوندگان و انسان از انگل *Lmajor* استاندارد با طول باند *bp* ۶۵۰ و *Ltropica* با طول باند *bp* ۷۵۰ استفاده گردید (تصویر ۳).

بحث

در این مطالعه استفاده از روش Nested-PCR اولین تلاش جهت ردیابی انگل *Lmajor* در گونه *P.papatasi* در استان فارس می‌باشد. به علاوه این اولین گزارش فلبوتوموس پاپاتاسی به عنوان ناقل قطعی و اصلی بیماری در این منطقه است.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد استفاده از روش Nested-PCR در مقایسه با روش ایزو آنزیم، بسیار سریع و حساس می‌باشد و با این روش به صورت مستقیم می‌توان عامل بیماری را از منبع اصلی و جمعیت وحشی پشه خاکی‌ها تعیین گونه نمود. از طرف دیگر روش ایزوآنزیم علی‌رغم دقت بیشتر آن، دارای معایبی می‌باشد که از آن جمله می‌توان نیازمندی به کشت تعداد زیاد انگل و احتمال آلودگی ثانویه ایزوله‌های اولیه انگل را نام برد (۱۱).

گونه *P.papatasi* به عنوان ناقل قطعی لیشمانیوز جلدی نوع روستایی از دیگر نقاط کشورمان مخصوصاً استان اصفهان نیز گزارش شده است (۱۱،۱۵).

مهم‌ترین یافته دیگر این تحقیق اثبات جونده گونه *M.libycus* به عنوان مخزن اصلی و قطعی بیماری در مناطق روستایی مرودشت می‌باشد. این گونه از دیگر کانون‌های هم‌جوار منطقه مورد مطالعه ما یعنی شهرستان‌های ارسنجان و نیریز هم به عنوان مخزن اصلی گزارش شده است (۱۲،۱۳،۱۴).

مریونس لیبیکوس از کشورهای عربستان سعودی (۵) و ازبکستان نیز به عنوان مخزن لیشمانیوز جلدی روستایی

گزارش شده است (۳). این گونه پراکنش وسیعی در مناطق مرکزی و جنوبی ایران دارد.

گونه *M.libycus* در مناطق مرکزی و شمال شرقی ایران که ژربیل بزرگ *R.opimus* همچنین غرب و جنوب غربی ایران که ژربیل هندی *T.indica* نقش اصلی مخزن را دارند به عنوان مخزن ثانویه ایفای نقش می‌کند، بنابراین با در نظر گرفتن مناطق مرکزی و شمال شرقی ایران (مخزن اصلی *R.opimus*)، غرب و جنوب غربی ایران (مخزن اصلی *T.indica*) و جنوب شرقی ایران مخزن اصلی بیماری *M.hurrinae* می‌باشد.

با توجه به نتایج این مطالعه در ایران یک منطقه دیگر هم در حال شکل گرفتن است که از جنوب استان اصفهان شروع شده و تا استان فارس ادامه می‌یابد، که در این ناحیه گونه مریونس لیبکوس به عنوان مخزن اولیه بیماری بوده و فلبوتوموس پاپاتاسی نقش ناقل قطعی ناقل را ایفا می‌کند (۱۲،۱۴).

سپاسگزاری

بدین وسیله نهایت تشکر خود را از انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران برای حمایت مالی این طرح ابراز می‌دارد. همچنین از کارمندان ایستگاه تحقیقات بهداشتی کازرون به‌خصوص آقای اسماعیل نجفی به دلیل همکاری در اقدامات صحرایی این طرح کمال امتنان را دارد.

Summary

Determination of Reservoir(s) and Vector(s) of Cutaneous Leishmaniasis by Nested-PCR in Marvdasht District, Fars Province, Southern Iran

Rassi Y., Ph.D.[1], Ghassemi MM., MSc.[2], Javadian E., Ph.D.[3], Motazedian H., Ph.D.[4], Rafizadeh S., M.Sc.[5], Aghaie Afshar A., MSc.[6], Rafinejad J., Ph.D.[7], Jalali M., MSc.[8]

1. Associate Professor of Medical Entomology and Vector Control, School of Health and Health Research Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. 2. Master of Science in Medical Entomology and Vector Control, School of Health & Health Research Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran & Health Research Center, Kazeroon, Shiraz, Iran. 3. professor of Medical Entomology and Vector Control, School of Health & Health Research Insitute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. 4. Associate Professor of Medical Parasitology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran. 5. Master of Science in Human Genetics, Tehran disease Control Center, Tehran, Iran. 6. Master of Science in Medical Entomology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran. 7. Assistant professor of Medical Entomology and Vector Control, School of Health & Health Research Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. 8. Master of Science in Medical Entomology, Health research Center, Kazeroon, Shiraz, Iran.

Introduction: Cutaneous leishmaniasis (CL) is an increasing public health problem in several parts of Iran. In southern parts, the incidence of CL has been doubled over the last decade. This epidemiological study was done for determination of reservoir(s) and vector(s) of cutaneous leishmaniasis in rural regions of Marvdasht, Fars province, southern Iran during 2003 and 2004.

Methods: A total of 126 rodents were collected from three villages using live traps and their Giemsa-stained smears were studied for leishmania infection. After DNA extraction from positive smears, Nested-PCR was used for the identification of parasite species. In another procedure, 200 sand flies were collected by aspirator and after species identification DNA extraction and PCR was done.

Results: The collected samples included *Meriones libycus* (75.4%), *Cricetulus migratorius* (14.3%) and *Microtus arualis* (10.3%). Eight out of 95 *Meriones libycus* (8.4%) were found to be infected with *Leishmania major*. None of the other species were positive. Among the collected female sandflies 75% were identified to be *Phlebotomus papatasi* and 2.7% of them were found with *L.major* infection.

Conclusion: Only 2.7% of *Phlebotomus papatasi* were found naturally infected with *Leishmania major*. This is the first report of detection of *L.major* by Nested-PCR in *P.papatasi* as a proven principal vector of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Fars province, south of Iran.

Key words: Reservoir, Vector, Cutaneous leishmaniasis, Nested-PCR, Fars, Iran

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2007; 14(2): 134-139

References

1. Alvar J and Barker JR. Molecular tools for epidemiological studies and diagnosis of leishmaniasis and selected other parasitic disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96(Suppl.): S1-S250.
2. Collins FH, Mendez MA, Rasmussen MO, Mehaffey PC, Besansky NJ, Finnerty V. A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the Anopheles gambiae complex. *Am J Trop Med Hyg* 1987; 37(1): 37-41.
3. Dejeux P. Information on the epidemiology and Control of the leishmaniasis, by country or territory. Geneva: World Health Organization, (document WHO/ LEISH/ 91. 30).
4. Etemad I. Mammals of Iran. Vol 1.(Rodents and Identification Key), publication of national society for Environmental Conversation, 1978.
5. Ibrahim EA, Mustafa MB, al Amir SA, al Seghayer SM, Hussein SM, Gradoni L Meriones libycus (Rodentia:Gerbillidae) a possible reservoir host of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Riyadh Province, Saudi Arabia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994; 88(1): 39.
6. Javadian E, Dehestani M, Nadim A, Rassi Y, Tahvildar-Bidruni Gh, Seyedi Rashti M.A., Shadmehr A. Confirmation of Tatera indica (Rodentia:Gerbillidae) as the main reservoir host of zoonotic cutaneous leishmaniasis in the west of Iran. *Iranian J Publ Health* 1998; 27 (1-2): 55-60.
7. Javadian E, Nadim A, Tahvidare-Bidruni G, Assefi V. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Iran: B. Khorassan part V : Report on a focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Esferayen. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 1976; 69(2): 140-3.
8. Motazedian H, 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.
9. Nadim A, Faghih M. The epidemiology of cutaneous leishmaniasis in the Isfahan province of Iran. I. The reservoir. II .The human disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1968; 62(4): 534-42.
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 the epidemiology of Leishmania tropica in Pakistan. *J Clin Microbiol* 1998; 36(10): 2877-81.
11. 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 Trop* 2005; 93(1): 75-83.
12. Rassi Y, Javadian E, Amin M, Rafizadeh S, Vatandoost H, Motazedian H. Meriones libycus is the main reservoir of zoonotic cutaneous leishmaniasis in south Islamic Republic of Iran. *East Mediterr Health J* 2006; 12(3-4): 474-7.
13. Rassi Y, Javadian E, Jalali M, Motazedian MH,Vatandoost H. Study on Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis in Arsanjan county, Fars province, southern Iran. *Iranian J Publ Health* 2004; 33(1): 28-32.
14. Rassi Y, Amin M, Javadian E, Motazedian H. Epidemiological studies on Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis in Neiriz focus, Fars province, South of Iran (2001-2002).6th International Meeting on Microbial Epidemiological Markers (IMMEM6), 27-30, 2003; 102, No.178Les Diablerets, Switzerland.
15. Seyedi-Rashti MA, Nadim A. The genus phlebotomus (Dip: Psychodidae, phlebotominae) of the countries of the Eastern Mediterranean region. *Iranian J Publ Health* 1992; 21:11-50.
16. Yaghoobi-Ershadi MR, Javadian E, Tahvildare-Bidruni GH. Leishmania major MON-26 isolated from naturally infected Phlebotomus papatasi (Dip:Psychodidae) in Isfahan province, Iran. *Acta Tropica* 1995; 59: 279-82.
17. Yaghoobi-Ershadi MR, Javadian E, Tahvildare-Bidruni GH. The isolation of Leishmania major from Phlebotomus (paraphlebotomus) caucasicus in Isfahan province, Islamic Republic of Iran. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994; 88(5): 518-9.