

مطالعه آلودگی جوندگان به لیشمانیازیس احشایی با روش‌های پارازیتولوژی، سرولوژی و مولکولی (PCR) در منطقه سراب از استان آذربایجان شرقی در سال ۹۱-۹۰

اسماعیل فلاح^{۱*}، عباس شهبازی^۱، نصیبه شهبازی^۱، احد بازمانی^۱، مجید خانمحمدی^۲

چکیده

لیشمانیازیس احشایی یکی از بیماری‌های عفونی - انگلی و مشترک در کشورهای حوزه مدیترانه و خاورمیانه از جمله ایران می‌باشد. عامل اصلی لیشمانیازیس احشایی در ایران لیشمانیا اینفانتوم و مخزن اصلی بیماری، سگ و سگ‌سانان می‌باشد. عفونت‌هایی از لیشمانیا اینفانتوم در جوندگان نیز به اثبات رسیده است. این تحقیق جهت بررسی عفونت لیشمانیازیس احشایی در میان جوندگان شهرستان سراب و نقش احتمالی جوندگان در انتقال بیماری به انسان با روش پارازیتولوژی، سرولوژی و مولکولی در سال ۹۰-۹۱ انجام گرفت. در این مطالعه ۱۰۰ جونده از چهار گونه و جنس مختلف بوسیله تله های زنده گیر صید شد که قبل از کشته شدن، نمونه‌های خون جوندگان داخل ویال‌های پلی پروپیلن جمع‌آوری شده و با استفاده از تست آکلوئیناسیون مستقیم (DAT) مورد آزمایش قرار گرفت. ۱ جونده (۱٪) دارای تیت سرمی مثبت و ۶ جونده (۶٪) دارای تیرهای سرمی پائین‌تر از مثبت و ۹۳ جونده سرم منفی بودند. تمام گسترش‌های تماسی تهیه شده از بافت کبد و طحال مورد مطالعه قرار گرفتند که در نهایت در هیچ کدام از آنها جسم لیژمن مشاهده نشد. قسمتی از بافت طحال و کبد جوندگان در محیط کشت NNN و RPMI 1640 کشت داده شدند، اما انگل لیشمانیا از محیط کشت‌ها جدا نشد. در نهایت از بافت طحال ۱۰۰ جونده استخراج DNA صورت گرفت و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی k-DNA آزمایش PCR انجام شد و در آزمایش مولکولی باند مربوط به جنس لیشمانیا مشاهده نگردید.

واژگان کلیدی: لیشمانیازیس احشایی، جوندگان، آکلوئیناسیون مستقیم (DAT)، سراب

تاریخ دریافت: ۱۹/۱۰/۹۲ تاریخ پذیرش: ۲۹/۲/۹۳

مقدمه

لیشمانیازیس احشایی یکی از بیماری‌های مهم مشترک در کشورهای حوزه مدیترانه و خاورمیانه از جمله ایران می‌باشد و عامل آن تک یاخته درون سلولی به نام لیشمانیا اینفانتوم

می‌باشد (۱ و ۲). شیوع سالانه لیشمانیازیس احشایی ۵۰۰ هزار نفر و مرگ و میر آن در نقاط مختلف در حدود ۷۵۰۰۰ نفر می‌باشد (۳ و ۴). پشه‌های خاکی ناقل لیشمانیا از خانواده پسیکودیده (Psychodidae) بیشتر متعلق به جنس‌های لوتزومیا (Lutzomyia) و فلبتوموس (Phlebotomus)، بوده و انگل را بین مخازن حیوانی و انسان انتقال می‌دهند (۲). سگ به عنوان مخزن اصلی و شغال و روباه از مخازن وحشی انگل به شمار می‌روند. البته سایر حیوانات نظیر جوندگان هم به عنوان مخزن مطرح می‌باشند (۶ و ۷). سگ‌های اهلی بدون علائم بیماری مهمترین مخزن برای پشه خاکی‌های ناقل جهت انتقال انگل به انسان هستند (۸ و ۷). مطالعات اپیدمیولوژیک متعددی که در سال‌های اخیر در برخی از مناطق کشور بر روی عامل بیماری، مخازن حیوانی، عفونت انسانی و ناقلین، نشان می‌دهد که عفونت لیشمانیازیس احشایی در انسان و بعضی از مخازن حیوانی، علاوه بر کانون‌های اندمیک قبلی شامل استان‌های اردبیل (مشکین‌شهر و مغان)، آذربایجان شرقی (اهر و کلیبر)، استان فارس (فیروزآباد و جهرم)، در سایر نقاط به صورت تک‌گیر (اسپورادیک) گزارش می‌گردد (۱۱ و ۱۰، ۹). شیوع سرمی بیماری در مناطق مختلف ایران از ۱۰ تا ۳۷٪ گزارش گردیده است (۱). اولین مطالعه‌ای که در سال ۱۳۴۲ در شمال شرق ایران بر روی مخازن لیشمانیا صورت گرفت، آلودگی جوندگان به انگل لیشمانیا را اثبات کرد (۱۲). در چندین مطالعه دیگر نیز آلودگی جوندگان به انگل لیشمانیا اثبات

*۱- مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، گروه انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی

تهران، تهریز، تهران Efallah37@gmail.com

۲- گروه علوم آزمایشگاهی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مرند، مرند، تهریز، ایران

شد (۷،۱۳ و ۱۴). با توجه به اینکه سوش جدا شده از جوندگان مشکین شهر و آذر شهر لیشمانیا اینفانتوم LON49 تعیین گردیده بود و این انگل دقیقاً همان سویه‌ای بود که از سگ و سگ سانان و نیز افراد مبتلا در آن مناطق جدا شده است (۷ و ۵). بنابراین می‌توان گفت که جوندگان نیز می‌توانند به عنوان یکی دیگر از مخازن لیشمانیازیس احشائی محسوب شوند. علی‌رغم آنکه روش قطعی جهت تشخیص لیشمانیازیس احشائی مشاهده اشکال اماسیتیکوت در گسترش‌های تهیه شده از بافت و مغز استخوان می‌باشد، ولی در زمانی که تعداد انگل کم باشد از حساسیت پایینی برخوردار است و همیشه به راحتی نمی‌توان انگل را مشاهده کرد (۱۵). در سال ۱۹۸۶ روش سرولوژی آکلوئیناسیون مستقیم (DAT) توسط Harith و همکاران برای تشخیص و سرواپیدمیولوژی لیشمانیازیس احشائی پیشنهاد شد (۱۶). با توجه به شرایط اکولوژیک شهرستان سراب هدف از این تحقیق مطالعه اپیدمیولوژیکی شیوع سرمی لیشمانیازیس احشائی بین جوندگان وحشی شهرستان سراب (آذربایجان شرقی) و نقش احتمالی جوندگان در انتقال این بیماری به انسان می‌باشد، برای اولین بار مطالعه‌ای با دید اپیدمیولوژیکی راجع به وضعیت کنونی این بیماری در جوندگان شهرستان سراب طی سال ۱۳۹۱ به اجرا در آمد.

مواد و روش کار

منطقه مورد مطالعه و موقعیت جغرافیایی

شهرستان سراب دارای وسعت ۳۴۵۲/۲ کیلومتر مربع رتبه سوم را بین شهرستان‌های استان آذربایجان شرقی دارا می‌باشد (۱۷). در این بررسی با هماهنگی‌های صورت گرفته با اداره کل محیط زیست و مراکز بهداشتی سراب مجموعاً ۱۰۰ جونده از مناطق مختلف سراب و روستاهای آن با استفاده از تله‌های زنده گیر از تیرماه ۱۳۹۰ تا آذرماه ۱۳۹۱ صید گردید. جوندگان صید شده به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده پزشکی انتقال و پس از بیهوشی با کلروفورم برای تعیین جنس و گونه جوندگان مشخصات ظاهری هر جونده از نظر جنس، رنگ، محل و

معاینات بالینی از نظر وجود علائم لیشمانیازیس احشائی شامل (ضایعات جلدی، ریزش مو، لاغری، زخم پوزه و گوش) معاینه شده و در فرم‌های خاصی که به این منظور تهیه شده بود، ثبت گردید. بعد از زنده‌گیری جوندگان بلافاصله کالبدگشایی شده و حدود ۱ میلی‌لیتر خون قلبی داخل لوله‌های پلی پروپیلن (Polypropylene) توسط سرنگ کشیده شد، بعد از گذشت ۱۰-۶ ساعت، نمونه‌های اخذ شده به آزمایشگاه منتقل و با استفاده از تکنیک‌های آزمایشگاهی و سانتریفیوژ با دور ۸۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه اقدام به جداسازی سرم‌ها گردید. در نهایت سرم‌ها جهت انجام تست DAT در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در محل کالبد شکافی ابتدا دو عدد گسترش تماسی از طحال یا کبد گرفته و بلافاصله با الکل متانل ۹۵٪ فیکس شده و در نهایت در آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده پزشکی تبریز با رنگ‌آمیزی گیمسا ۱۰٪ نمونه‌ها مورد بررسی‌های پارازیتولوژی از نظر جسم لیشمن قرار گرفتند. بخش کوچکی از طحال و کبد حیوانات را در محیط‌های کشت اختصاصی لیشمانیا اینفانتوم شامل NNN و RPMI 1640 همراه با ۲۰٪ سرم جنینی گاو کشت داده شدند. جهت انجام تست گلوئیناسیون مستقیم از آنتی ژن لیشمانیا اینفانتوم که در آزمایشگاه مرکز مبارزه با بیماری‌های عفونی براساس روش هاریث و همکاران ۱۹۸۶ تهیه شده بود، استفاده گردید (۸). در این روش آنتی ژن در مجاورت رقت‌های مختلف سرم جوندگان قرار داده شد، که در صورت حضور آنتی‌بادی اختصاصی در سرم، پس از گذشت ۲۴ ساعت آکلوئیناسیون صورت می‌گرفت (۱۸). در هر بار آزمایش از یک سرم مثبت به عنوان شاهد مثبت و از یک سرم منفی به عنوان شاهد منفی برای کنترل در کنار نمونه سرم جوندگان استفاده شد. از نظر تشخیص آنتی بادی لیشمانیا در مخازن تیتیر ۱:۳۲۰ و بالاتر مثبت و تیتیرهای پایین‌تر از آن تا ۱:۸۰ مشکوک و تیتیرهای پایین‌تر منفی محسوب می‌شدند (۱۲). در آزمایش مولکولی با استفاده از روش PCR-kDNA پس از استخراج DNA از بافت طحال با استفاده از پرایمرهای اختصاصی 5, F1 (TCGAGAACGCCCTACC)-kDNA

مشاهده نشد. با در نظر رفتن تیتراژ ۳۲۰:۱ و بالاتر مثبت و تیتراژ ۸۰:۱ به عنوان تیتراژ مشکوک از مجموع ۱۰۰ جوندگان صید شده یک (۱٪) جوندگان دارای تیتراژ مثبت، ۴ (۴٪) جوندگان دارای تیتراژ ۱/۸۰ و مشکوک، ۲ (۲٪) جوندگان دارای تیتراژ پائین تر از ۱/۸۰ و ۹۳ (۹۳٪) جوندگان دیگر از نظر سرولوژی منفی بودند. نتایج حاصل از کشت انگل در محیط کشت NNN,RPMI 1640 و منفی بود و انگل لیشمانیا از کشت بافت ها ایزوله نشد. برای اطمینان بیشتر از نتایج آزمایشات انجام شده از بافت های طحال ۱۰۰ جوندگان صید شده استخراج DNA صورت گرفت و بر روی آنها PCR انجام شد. در آزمایشات مولکولی بانندی که مربوط به جنس لیشمانیا باشد، مشاهده نشد.

و 3,R1-(AGGGGTTGGTGTAATAAGG) برای جنس لیشمانیا، آزمایش PCR انجام گرفت، پرایمرهای بکار رفته، پرایمرهای توصیه شده برای روش PCR-kDNA توسط فرج نیا و همکاران بود (۱۹).

نتایج

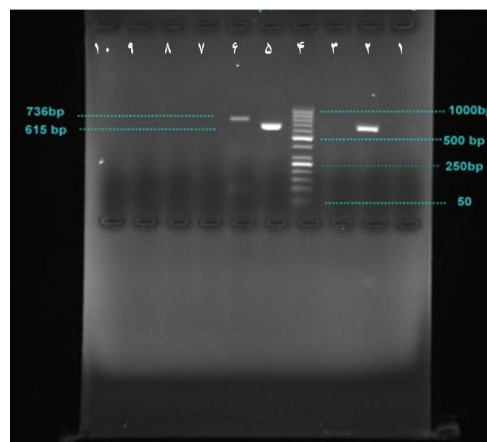
در این بررسی مجموعاً ۱۰۰ جوندگان از چهار جنس و گونه مختلف صید گردید که شامل ۵۴٪ موش خانگی (*Mus musculus*)، ۳۸٪ مریونس پرسیکوس (*Meriones persicus*)، ۷٪ هامستر خاکستری (*Cricetulus migratorius*) و ۱٪ هامستر طلائی (*Mesocetus auratus*) بودند. از نظر پارازیتولوژی در گسترش های تماسی تهیه شده از ۱۰۰ جوندگان اجسام لیشمن

جدول ۱- نتایج کلی تست DAT جهت تعیین عیار آنتی بادی بر علیه لیشمانیا در جوندگان صید شده در شهرستان سراب سال ۹۱-۹۰

گونه	تعداد	منفی	۱:۴۰	۱:۸۰	۱:۱۶۰	۱:۳۲۰
موش موسکولوس (<i>Mus musculus</i>)	۵۴	۵۰	۲	۱	-	۱
مریونس پرسیکوس (<i>Meriones persicus</i>)	۳۸	۳۷	-	۱	-	-
هامستر خاکستری (<i>Cricetulus migratorius</i>)	۷	۵	-	۲	-	-
هامستر طلائی (<i>Mesocetus auratus</i>)	۱	۱	-	-	-	-
کل	۱۰۰	۹۳	۲	۴	-	۱

بحث

سازمان بهداشت جهانی WHO عفونت ناشی از *L. infantum* را بعنوان یکی از ۶ بیماری عفونی مهم انسان در دنیا اعلام نموده است. مخزن اصلی بیماری سگ و سگ سانان ولی در جوندگان نیز دیده شده است (۵ و ۷). علاوه بر نقش قطعی سگ ها به عنوان مخزن اصلی درصد نسبتاً بالایی از جوندگان در مشکین شهر و آذر شهر از نظر سرولوژیکی نسبت به لیشمانیازیس احشایی مثبت بودند (۵ و ۷). در مطالعات Bella در ایتالیا در سال ۲۰۰۳ از ۶۰ جوندگان صید شده انگل لیشمانیا اینفانتوم تنها از *Rattus norvegicus* جدا شد (۱۳). در مطالعات Ashford در سال ۱۹۹۶ در اسپانیا انگل لیشمانیا از *Rattus Rattus* جدا شد (۱۴). مطالعات مشابه دیگری نیز



نگاره ۱- ژل الکتروفورس محصولات PCR- K-DNA در نمونه های مختلف، از راست به چپ: ۱- کنترل منفی بدون DNA ۲- کنترل مثبت لیشمانیا ماژور استخراج شده از محیط کشت ۴- مارکر ۱۰۰ جفت بازی ۵- کنترل مثبت لیشمانیا ماژور استاندارد تجاری ۶- لیشمانیا اینفانتوم استخراج شده از محیط کشت ۳، ۷، ۸، ۹، ۱۰- نمونه های مربوط به جوندگان

جونده ای از گونه مریونس پرسیکویس عفونت لیشمانیا به طور طبیعی دیده شد. در این مطالعه از گسترش‌های تهیه شده از خون و اندام‌های داخلی جونده اماستیگوت مشاهده نشد ولی در گسترش تهیه شده از زخم روی پوست اماستیگوت مشاهده شد که احتمال لیشمانیوز جلدی را در مریونس پرسیکوس گزارش کردند (۲۴). در مطالعه مشابه دیگری در سال ۱۳۸۲ در آذرشهر از ۲۵۶ جونده صید شده ۱۴ جونده دارای تیتراژ ۱:۸۰ و بالاتر که از این تعداد ۵ جونده دارای تیتراژ مثبت بودند، لیشمانیا اینفانتوم از یک هامستر خاکستری و یک هامستر طلائی جدا شد (۵). با استناد به آزمایشات سرولوژی در این تحقیق و مطالعات انجام یافته در مناطق مختلف که در متن اشاره شد، می‌توان گفت جوندگان می‌توانند به عنوان یکی از مخازن لیشمانیوز احشایی در انتقال بیماری به انسان و سایر حیوانات نقش داشته باشند. در این مطالعه ۱٪ از جوندگان از نظر لیشمانیوز احشایی و در مطالعه خانمحمدی و همکاران ۹/۱٪ از سگ سانان سراب به روش سرولوژی آلوده گزارش شدند (۱۱). با توجه به همجواری سراب با مناطق اندمیک بیماری احتمال آلودگی بیشتر در منطقه وجود دارد که با مطالعات وسیع در طی زمان بیشتر و روی تعداد بیشتری از جوندگان و همچنین با مطالعه روی ناقلین می‌توان با قاطعیت بیشتر لیشمانیازیس را در این منطقه ثابت کرد.

تشکر و سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی تبریز و بعنوان طرح شماره ۱۶-۹۰ آن مرکز اجرا گردیده است. «این مقاله منتج از پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد خانم نصیبه شهبازی با شماره پایان‌نامه ۲/۳-۹۰/۲ می‌باشد.»

در سایر نقاط اندمیک جهان صورت گرفته است. انگل لیشمانیا اینفانتوم از *Rattus rattus* در عراق و ترکیه گزارش گردیده است (۲۰). در مناطق اندمیک لیشمانیازیس احشایی در برزیل بیشترین گونه جوندگان *Rattus rattus* و *Thrichomys apereoides* بودند که از چندین گونه *Rattus rattus* لیشمانیا دنوانی، لیشمانیا مکزیکانا و لیشمانیا برازیلیس جدا شدند (۲۱). در سال ۲۰۰۹ در مطالعه‌ای در یونان از ۱۶ جونده انگل لیشمانیا اینفانتوم را از *Rattus norvegicus* جدا کردند (۲۲). در این مطالعه از ۱۰۰ جونده صید شده یک (۱٪) جونده از نظر سرولوژی دارای تیتراژ مثبت و ۱:۳۲۰ مثبت و ۶ (۶٪) جونده دارای تیتراژ کمتر بودند، که تیتراژ مثبت و دو مورد تیتراژ مشکوک مربوط به موش خانگی بود. ولی در گسترش‌های تماسی بافتی جسم لیشمن مشاهده نشد. محیط‌های کشت از نظر وجود انگل لیشمانیا منفی بودند. در مطالعه دیگری در مشکین شهر توسط مجبعلی و همکاران در مشکین شهر صورت گرفت از ۴۱۹ جونده صید شده ۸ جونده (۶/۲٪) از نظر سرولوژی مثبت بوده که از ۳ جونده به روش مولکولی دو مریونس پرسیکوس، لیشمانیا دنوانی LON-50 و از یک هامستر طلائی لیشمانیا اینفانتوم LON-49 جدا شد. این گونه از لیشمانیا اینفانتوم در این منطقه از سگ و انسان نیز جدا شده بود که در این مطالعه احتمال نقش جوندگان به عنوان انتقال دهنده بیماری به انسان بیشتر بروز می‌کند (۱۴). در سال ۱۹۹۵ در مشکین شهر در مطالعه صورت گرفته توسط مجبعلی و همکاران از ۱۲۰ جونده صید شده در این منطقه ۱۶ جونده (۱۳/۳٪) از نظر سرولوژی با روش (DAT) مثبت گزارش شدند. از مجموع ۴۱۹ جونده ۷ موش خانگی بود و تنها ۶ سر دارای تیتراژ ۱:۱۰ بود، و در اسمیر هیچ یک از موش‌های خانگی جسم لیشمن مشاهده نشد (۲۳). در مطالعه‌ای در سال ۱۹۷۵ در منطقه آذر بایجان شرقی توسط ادریسیان در

فهرست منابع

1. Mohebali, M., Hajjaran, H., Hamzavi, Y., Mobedi, I., Arashi, S., Zarei, Z., Akhouni, B., Naeini, K.M., Avizhe, R., Fakhar, M. (2005): Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran. *Vet. Parasitol.* 129: 243-251.
2. WHO (1993): Epidemiology, diagnosis and control of leishmaniasis in the mediterranean area MZCP/LEISH/93.3 Athens, Greece.
3. Desjeux P. (2004): Leishmaniasis; current situation and new perspectives. *CIMID.* 27: 305-318.
4. Hamidi, A.N., Nadim, A., Edrissian, G.H., Tahvildar-Bidrouni, G.H., Javadia, E. (1982): Visceral leishmaniasis of jackals and dogs in northern Iran. *Trans R Soc Trop. Med. Hyg.* 76: 756-757.
5. Fallah, E., Farshchian, M., Mazlomi, A., Majidi, J., Kusha, A., Mardi, A., Mahdipoorzareh, N. (2005): Study on the prevalence of visceral Leishmaniasis in rodent's of Azarshahr district (new focus), northwest of Iran. *Arch. Razi Institute.* 61(7): 27-33.
6. Mohebali, M., Motazedian, M.H., Parsa, F., Hajjaran, H. (2002): Identification of Leishmania species from different parts of Iran using a random amplified polymorphic DNA in human, animal reservoirs and vectors. *Med. J. Islam. Repub. Iran.* 15: 243-246.
7. Mohebali, M., Poormohammadi, B., Kanani, A., Hajjaran, H., Edrissian, G.H. (1998): Rodents: another group of animal hosts of visceral leishmaniasis in Meshkinshahr district, Islamic Republic of Iran. *LRS. Mediterr. Ori.* 4(2): 376-378.
8. Moshfe, A., Mohebali, M., Edrissian, G.H., Zarei, Z., Akhouni, B., Kazemi, B., Jamshid, S.H., Mahmoodi, M. (2008): Seroepidemiological Study on Canine Visceral Leishmaniasis in Meshkin-Shahr District, Ardabil Province, Northwest of Iran during 2006-2007. *Iranian. J. Parasitol.* 3(3): 1-10.
9. Edrissian, G.H., Hafizi, A., Afshar, A., Soleimanzadeh, G.H., Movahed Danesh, A.M., Garoussi A. (1988): An endemic focus of visceral leishmaniasis in Meshkin-shahr, East Azerbaijan Province, Northwest part of Iran and IFA serological survey of disease in this area. *Bull. de la socie. Patho. Exot.* 81:238-248.
10. Mohebali, M., Bahman rokh, M., Mosavifar, A. (2000): Parasitological and histopathological study of visceral leishmaniasis in a number of Dogs in Meshkinshahr. *Paghoh. va Sazan.* 37: 10: 4, 122-25.
11. Khanmohammadi, M., Fallah, E., Rahbari, S., Sohrabi, I., Farshchian, M., Hamzavi, F., Mohammadpour, A, A. (2010): Seroepidemiological survey of canine Visceral leishmaniasis in Sarab District Azerbaijan Province, Northwest of Iran in 2009. *Afric. J. Micro. Res.* 4(19):2022-2028.
12. Nadim, A., Faghieh, M. (1968): The epidemiology of cutaneous leishmaniasis in the Isfahan province of Iran. *Transactions of the Royal Society of Tropica Medicine and Hygiene.* 62:534-42.
13. Di Bella, C., Vitale, F., Russo, G., Greco, A., Milazzo, C., Aloise, G and Cagnin, M. (2003): Are rodents a potential reservoir for Leishmania infantum in Italy? *J. Moun. Ecology.* 7 (Suppl.):125-129.
14. Ashford, R.W. (1996): Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin. Derma.* 14:523-532.
15. Handemir, E., Oncel, T., Kamburgil. (2004): Seroprevalence of visceral Leishmaniasis in stray Dogs Istanbul. *Turk. Paraz. Derg.* 32(3):183-6.
16. Harith, AE., Kolk, AH., Kager, PA. (1986): A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and sero epidemiological studies of visceral Leishmaniasis. *Tran. R Soc. Med. Hyg.* 80(4):583-7.
17. Statistical calendar of East Azerbaijan Province 2002 and management and planning organization east Azerbaijan Province, GIS Unit.
18. Edrissian, G.H., Ahanchin, AR., Gharachahi, AM., Ghobani, M. (1993): Seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis and search for animal reservoirs in Fars province, Southern Iran. *Iran. J. Med. Scie.* 18(3&4):99-105.
19. Farajnia, S., Alimohammadian, M.h., Reiner, N.E., Karimi, M., Ajdari, S., Mahoudi, F. (2010): Molecular characterization of a novel

- amastigote stage specific Class I nuclease from *Leishmania major*. Intern. J. para. 34:899-08.
20. Desjeux, P. (1991): Information on the epidemiology and control of the leishmaniasis by country or territory. world heal. organ. leish. 91.30.
 21. Fernanda S.O., Pirmez C., Pires M.Q., Brazil R.P., Pacheco R.S. (2005): PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. Vet. Parasitol. 129(3-4):219-27.
 22. Papadogiannakis E., Spanakos G., Kontos V., Menounos P.G., Tegos N., Vakalis N. (2010): Molecular detection of *Leishmania infantum* in wild rodents (*Rattus norvegicus*) in Greece. Zoon. Public. Health. 57(7-8):e23-5.
 23. Mohebbali, M., Nasiri, M., Kanani, A., Edrissian, GhH., Anvari, S., Nadim, A. (1995): *Cricetulus migratorius* (gray hamster) another possible animal reservoir of Kala-Azar in Meshkin Shahr. Iran. J. Pup. Health. 243-4.
 24. Edrissian GH, (1975): *Meriones persicus*, another probable reservoir of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 69(5-6):517-9.