آلودگی جونده رومبومیس اپیموس به انگل لیشمانیا ماژور درکانون لیشمانیوز جلدی روستایی شهرستان دامغان

صادق محمدی ازنی[1*]، یاور راثی[2]، محمدعلی عشاقی[3]، مهدی محبعلی[4]، محمدرضا عبایی[5]، هما حجاران[6]

۱.کارشناس ارشد حشره شناسی پزشکی ومبارزه با ناقلین ، مرکز بهداشت شهرستان دامغان، دانشگاه علوم پزشکی سمنان
۲. حشره شناس پزشکی ومبارزه با ناقلین، استاد دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳. حشره شناس پزشکی ومبارزه با ناقلین، دانشیار دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۴. انگل شناس و قارچ شناس پزشکی، استاد دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۵. حشره شناس پزشکی ومبارزه با ناقلین، مربی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۶. انگل شناس قارچ شناس پزشکی، دانشیار دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

* **نشانی برای مکاتبه:** دانشگاه علوم پزشکی دامغان، مرکز بهداشت دامغان، sadegh_azni@yahoo.com

دریافت مقاله: آذر نود پذیرش برای چاپ: دی نود

چکیده

سابقه و هدف: *لیشمانیوز جلدی روستایی کی از بیماری های شایع ومهم در جهان وایران است. در این نوع بیماری جوندگان به عنوان مخزن بیماری نقش ایفا می کنند. شناسایی مخزن بیماری جهت اجرای برنامه کنترل اهمیت زیادی دارد. این مطالعه به منظور تعیین مخزن بیماری و بررسی آلودگی جوندگان به انگل لیشمانیا در مناطق روستایی شهرستان دامغان در سال ۱۳۸۷ صورت گرفت.*

روش کار: *این مطالعه از نوع کاربردی است که در تابستان سال ۱۳۸۷ انجام شد. جوندگان با استفاده از تله های زنده گیروطعمه مناسب صید شدند. ازجوندگان پس از تعیین هویت نمونه برداری به عمل آمد که به صورت تهیه اسمیر و کشت در محیط RPMI1640 بود. اسمیر های تهیه شده رنگ آمیزی گیمسا شده و از نظر وجود اجسام لیشمن بررسی شدند. محیط کشت و اسمیرهای تهیه شده از جونده در فرایند استخراج DNA قرار گرفتند. به منظور جستجو برای انگل لیشمانیا از تکنیک Nested PCR با تکثیر kDNA استفاده شد.*

یافته ها: ت*عداد ۱۰ جونده رومبومیس اپیموس به وسیله تله های زنده گیر صید و تعیین هویت شد. آزمایشات نشان داد تعداد ۴ جونده رومبومیس اپیموس(۴۰٪) آلوده به انگل لیشمانیا ماژور هستند.*

نتیجه گیری: *با توجه به وفور بالای رومبومیس اپیموس و آلودگی بالای آن به انگل لیشمانیا ماژور می توان نتیجه گرفت که این گونه مخزن اصلی بیماری لیشمانیوز جلدی نوع روستایی در منطقه تحت مطالعه است. لذا به منظور کنترل بیماری در منطقه مبارزه با جوندگان در شعاع ۵۰۰ متری اماکن انسانی توصیه می شود.*

واژگان کلیدی: ***لیشمانیوز جلدی روستایی – رومبومیس اپیموس- لیشمانیا ماژور- PCR- دامغان***

مقدمه

لیشمانیوز جلدی یکی از بیماریهای مشترک بین انسان وحیوان می باشد که دربیش از ۸۸ کشور دنیا و به دو شکل خشک(شهری)ومرطوب(روستایی) دیده می شود. معمولاً بیماری به صورت زخم هایی در نقاط باز بدن که بیشتر درمعرض گزش پشه خاکی است بروز پیدا می کند. ضایعات در نوع شهری غالباً روی صورت ودر نوع روستایی بیشتر بر روی دست وپا ظاهر می شوند(۳-۱). بیماری در ایران نیز به صورت بومی وجود دارد،بطوریکه در بیش از نیمی از استانهای کشور ما گزارش شده است(۴). استان سمنان نیز یکی از مناطق مهم کشور می باشد که هر ساله موارد زیادی بیماری لیشمانیوز جلدی روستایی از آن گزارش می شود و بیشترین بروز مربوط به دو شهرستان شاهرود و دامغان می باشد.

در لیشمانیوز جلدی نوع روستایی عامل بیماری انگل لیشمانیا ماژور می باشد که توسط گزش ناقل بیماری که پشه خاکی می باشد به میزبان های مختلف از جمله انسان منتقل می شود. مخزن بیماری جوندگان وحشی می باشند که توانایی نگه داری انگل در بدن خود را دارند و موجب آلودگی پشه خاکی ها درحین خون خواری از آنها می شوند(۱،۲،۵). در مناطق مختلف ایران گونه های مختلفی از جوندگان به عنوان مخزن نقش ایفا می کنند به طوریکه رومبومیس اپیموس در قسمت های مرکزی وشمال شرقی کشور،تاترا ایندیکا و نزوکیا ایندیکا در قسمت های جنوب وجنوب غربی ، مریونس هوریانه در جنوب شرقی و مریونس لیبیکوس در شمال نطنز و برخی از شهرهای استان فارس مخزن اصلی مطرح هستند. همچنین نقش مریونس لیبیکوس به عنوان مخزن ثانویه در برخی نقاط مانند اصفهان، لطف آباد ، ترکمن صحرا وخوزستان ثابت شده است(۱۰-۶).

جهت برآورد میزان آلودگی لیشمانیایی مخازن روش های کلاسیک از جمله روش های میکروسکوپی ، کشت انگل وتزریق به حیوان حساس آزمایشگاهی وجود دارد. این روش ها پر زحمت و وقت گیر بوده و قادر به تعیین گونه و زیر گونه انگل نیستند و لازم است از سایر روش های تکمیلی نظیر مطالعات ایزوآنزیمی برای تعیین گونه و زیر گونه انگل جداسازی شده استفاده گردد که این روشها هم دارای محدودیت هایی هستند. از آن جمله می توان به حساسیت پایین در موارد کم بودن انگل و دشواری انجام مراحل آن به ویژه زمانی که لازم است مطالعه در سطح وسیعی انجام شود اشاره کرد . همچنین بروز آلودگی در هنگام انتقال به محیط کشت و عدم امکان رشد پروماستیگوت های گونه های مختلف در شرایط وجود آلودگی مخلوط ز موارد محدود کننده می باشد(۱۱). در روش های نوین مولکولی مبتنی بر PCR مشکلات فوق کمتر شده وبا استفاده از مقدار کمی از DNA بافت آلوده می توان برای جستجوی انگل اقدام نمود(۱۲،۱۳). جهت یافتن آلودگی به انگل لیشمانیا از بخش های مختلف ژنوم انگل استفاده می شود. بهترین روش برای جستجوی انگل و بررسی های اولیه استفاده از minicircle kDNA است چرا که در هر سلول حدود ۱۰ هزار کپی از آن وجود دارد(۱۱،۱۴،۱۵).

این مطالعه به منظور تعیین مخزن بیماری و بررسی آلودگی جوندگان به انگل لیشمانیا در مناطق روستایی شهرستان دامغان در سال ۱۳۸۷ صورت گرفته است.نوع مطالعه کاربردی بوده وبه روش مقطعی انجام گرفته است. برای تعیین هویت انگل لیشمانیای جدا شده از جوندگان روش PCR با تکثیر kDNA به کار گرفته شد. این پژوهش اولین تحقیق جهت تعیین آلودگی جوندگان به روش فوق الذکردراستان سمنان می باشد.

روش کار

با توجه به آمار مرکز بهداشت شهرستان دامغان در خصوص موارد لیشمانیوزجلدی صید جونده در روستاهای آلوده انجام گردید. به منظور صید جونده از تله های سیمی زنده گیر با طعمه های مختلف نظیرخیار ، گوجه فرنگی، گردو و نان تفت داده در روغن استفاده شده است. فاصله لانه های جوندگان ازروستاهای تحت مطالعه کمتر از ۵۰۰ متر بود. به این منظور در ماه های مختلف سال در هر نوبت اقدام به نصب حداقل ۲۰ وحداکثر ۴۰ عدد تله زنده گیردرنواحی حاشیه ای روستاهای تحت مطالعه شد. تله گذاری درتمام مدت شبانه روز انجام شد.

جوندگان پس ازصید به منظور تشخیص گونه وبررسی آلودگی به آزمایشگاه انتقال داده شدند.در آزمایشگاه جهت بیهوش کردن آنها از کتامین استفاده شد. پس از بیهوشی، گوش جونده با صابون مایع شستشو وآبکشی شد. پس از ضد عفونی کردن محل ضایعه با بتادین رقیق و الکل با استفاده از واکسینواستیل استریل مقداری از سروزیته در کنار شعله درون محیط های کشت NNN و RPMI منتقل گردید. همچنین از محل تهیه سروزیته گسترش های نازک بر روی لام های آزمایشگاهی تهیه شد. محیط های کشت پس از افزودن آنتی بیوتیک های مناسب به انکوباتور منتقل شدند. گسترش های تهیه شده بر روی لام ها پس از فیکساسیون با متانول ، به وسیله گیمسا رنگ آمیزی ومورد مطالعه میکروسکوپی قرار گرفتند. جوندگان صیده شده نیز با استفاده از خصوصیات مرفولوژیک با استفاده ازکلید تشخیص معتبر تا حد گونه تشخیص داده شد(۱۶).

به منظور استخراج DNA انگل لیشمانیا از روی لام و محیط کشت ازکیت مخصوص(Bioneer,South Korea) استفاده شد. در این مطالعه، برای تشخیص آلودگی از روش حساس دومرحله ای Nested PCR و پرایمرهای طراحی شده توسط Noyes و همکاران استفاده شد(۱۷). این پرایمرها بر اساس ناحیه حفاظت شده حلقه های کوچک kDNA (Minicircle) طراحی شده و برای انگل های L.infantum و L.donovani محصول PCR به طول ۶۸۰ bp، برای انگل L.tropica طول باند ۷۵۰ bp و برای انگل L.major طول باند ۵۶۰ bp ایجاد می نماید. مشخصات پرایمر های استفاده شده در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱: مشخصات پرایمر های مورد استفاده در تکثیر kDNA انگل لیشمانیا

نام واکنش	نام پرایمر	توالی
مرحله اول Nested PCR	CSB 2XF	5´-C/GA/GTA/GCAGAAAC/TCC CGTTCA -3´
	CSB 1XR	5´-ATTTTTCG/CGA/TTTT/CGC AGAACG-3´
مرحله دوم Nested PCR	13Z	5´-ACTGGGGGTTGGTGTAAAA TAG-3´
	LIR	5´-TCGCAGAACGCCCCT-3´

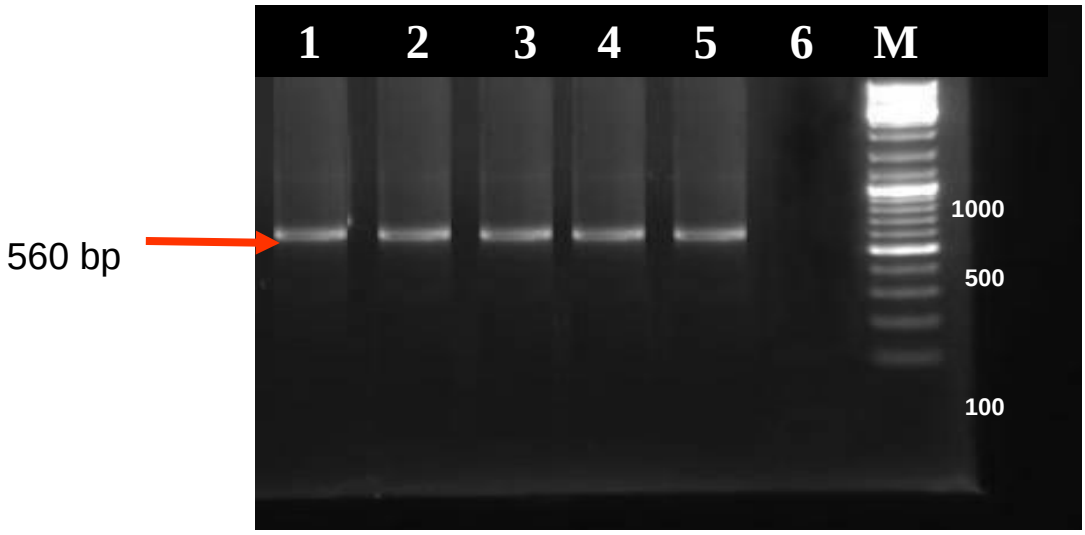
مواد لازم برای مرحله اول PCR برای هر نمونه که تمامی آنها از شرکت سیناژن ایران تهیه شد شامل: Taq DNA Polymerase به میزان ۰/۷۵ میکرولیتر، بازهای دئوکسی نوکلئوتید ۲/۵میلی مول،کلرومنیزیوم دو میلی مول، بافرPCR ۲/۵میکرولیتر ومیزان ۷-۲ میکرولیتر DNA مربوط به جونده و۴۰ نانوگرم از آغازگرهایCSB2XF و CSB1XR بود. حجم کل واکنش را با اضافه کردن مقدار مناسب ddH_2O به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد و در دستگاه Thermocycler با مشخصات Ependorf مدل Personal برنامه حرارتی (مرحله اول: دمای 94^oC به مدت ۵ دقیقه، مرحله دوم که ۳۰ بار تکرار گردید: ۱- دمای94^oC به مدت ۳۰ ثانیه ۲- دمای55^oC به مدت ۱ دقیقه ۳- دمای 72^oC به مدت ۹۰ ثانیه) جهت تکثیر قطعه خالص DNAاستفاده شد.

از محصول PCR به دست آمده در مرحله بالا برای PCR مرحله دوم استفاده شد. بدین صورت که مقدار ۱میکرولیتر از محصول مرحله اول را با ۹ میکرولیتر ddH_2O مخلوط کرده و از این مخلوط مقدار ۲میکرولیتر جهت مرحله دوم PCR استفاده شد. آغازگرهای این مرحله 13Z و LIR بوده اند. سایر مواد بکار رفته همانند مرحله اول بود. حجم نهایی واکنش را با اضافه کردن مقدار مناسب ddH_2O به ۳۰ میکرولیتر رسانده و برنامه PCR همانند مرحله اول اجرا شد.

پس انجام مرحله دوم Nested PCR ،محصول واکنش آن بر روی ژل آگارز یک درصد حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز شد. سپس بر روی دستگاه ایلومیناتور گذاشته ودر صورت مشاهده باندهای DNA، از آن عکسبرداری شد و گونه انگل با توجه به شاخص وزنی محصولات PCR تشخیص داده شد.

یافته ها

در این تحقیق در روستاهای تحت مطالعه شهرستان دامغان تعداد ۱۰ جونده رومبومیس اپیموس توسط تله های زنده گیر صید وتعیین هویت شد. در مطالعه میکروسکوپی لام های گرفته شده از گوش جونده ومشاهده محیط های کشت مشخص شد که تعداد چهار جونده رومبومیس اپیموس آلوده به انگل لیشمانیا هستند. پس از پایان آزمایشات Nested PCR والکتروفورز محصولات واکنش ، باندهای مشاهده شده ۵۶۰bp بود که نشان گر آلودگی به انگل لیشمانیا ماژور می باشد (تصویر ۱). این آزمایشات نشان داد که ۴۰٪ درصد نمونه های جوندگان مورد آزمایش آلوده به انگل لیشمانیا ماژور هستند.



تصویر ۱ : الکتروفورز محصول PCR تکثیر kDNA : ستون ۴-۱ : انگل لیشمانیا ماژور جدا شده از رومبومیس اپیموس، ستون ۵: لیشمانیا ماژور استاندارد(MHOM/IR/54/LV39)، ستون ۶: کنترل منفی و M : نشانگر ۱۰۰ جفت بازی سیناژن

بحث

کنترل لیشمانیوز در مناطق بومی نیازمند آگاهی از اکولوژی واپیدمیولوژی مخزن بیماری است. مشخص شدن مخزن مستلزم جدا کردن انگل عامل بیماری از آن می باشد(۱۸،۱۹).

مهمترین مزایای روش های مولکولی حساسیت و ویژگی آن وعدم وابستگی و به تعداد انگل لیشمانیا می باشد زیرا در روش کلاسیک نظیرکشت و تزریق به حیوان حساس سختی کار، حجم زیاد نمونه ها وامکان آلودگی انگل جداشده مطرح است. افزون برآن بعد از جدا سازی موفقیت آمیز انگل بایستی با کمک روش های مولکولی مانند تکنیک PCR ویا روش ایزوآنزیم به تعیین هویت انگل اقدام نمود(۱۳-۱۱). در این مطالعه برای تعیین هویت انگل از روش Nested PCR با تکثیر kDNA مربوط به انگل لیشمانیا در نمونه های جدا شده از جونده استفاده شد.

نتایج این مطالعه در تکثیر kDNA نشان داد این قسمت برای یافتن آلودگی وتعیین گونه بسیار مناسب است به علت اینکه از این قسمت از ژنوم به تعداد زیادی در انگل موجود می باشد لذا می توان از این روش جهت تعیین آلودگی و بررسی گونه های انگل لیشمانیا در ناقلین و زخم های انسانی نیز استفاده کرد (۱۷،۲۰،۲۱).

نتایج این تحقیق نشان داد که انگل جداشده لیشمانیا ماژور بوده که عامل بیماری لیشمانیوز جلدی نوع روستایی است(۱). در این تحقیق جونده رومبومیس اپیموس آلوده به انگل لیشمانیا ماژور بود که با توجه به وفور بالا در منطقه،این جونده گونه غالب بوده و از آنجا که ۴۰٪ آنها آلودگی داشته اند، می توان نتیجه گرفت که مخزن اصلی بیماری لیشمانیوز جلدی نوع روستایی در منطقه می باشد.این گونه، مخزن اصلی لیشمانیوز جلدی روستایی در قسمت های شمال و شمال شرقی کشورمان نیز می باشد. کانون های این مناطق شامل اصفهان، ترکمن صحرا، لطف آباد، اسفراین، شاهرود، ورامین و ابردژ می باشند(۱، ۱۴-۲۲).

حضور جونده رومبومیس اپیموس با وفورنسبتاً بالا، نزدیکی محل زندگی انسان با لانه جوندگان،توسعه فعالیت های کشاورزی، وجود شرایط مناسب مانند کشت غلات درمنطقه به بومی بودن بیماری در منطقه کمک کرده است. لذا جهت کاهش بروز بیماری می بایست کنترل جوندگان در برنامه ریزی های بهداشتی در اولویت قرار گیرد.

به منظور کنترل بیماری در منطقه پیشنهاد می گردد برنامه مبارزه با جوندگان با استفاده از طعمه مسموم ۲/۵ درصد سم فسفر دوزنگ در شعاع ۵۰۰ متری روستاهای آلوده انجام گردد. عملیات مبارزه با مخزن در سال اول ۴ بار در ماههای اردیبهشت،خرداد،تیر و شهریور صورت گیرد و پس از آن هر دوسال یک بار در ماه اردیبهشت قبل از فعالیت پشه خاکی ها توصیه می گردد(۱۸،۱۹، ۲۵، ۲۶).

نتیجه گیری

باتوجه به نتایج این تحقیق جونده رومبومیس اپیموس مخزن اصلی و قطعی بیماری لیشمانیوز جلدی در منطقه است. لذا جهت پیشگیری و کنترل بیماری اجرای روش های مناسب مبارزه با این جونده پیشنهاد می گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه تحت عنوان« بررسی ناقلین و مخازن لیشمانیوز جلدی روستائی در کانون شهرستان دامغان- استان سمنان» درمقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۸۷و کد ۴۱۹۵ می باشد که در قالب طرح تحقیقاتی مصوب سال ۱۳۸۶ به کد ۶۷۳۰ با حمایت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران اجرا شده است. به این وسیله از حمایت کنندگان این طرح سپس گزاری می شود.

REFERENCES

1. Nadim A, Javadian E, Mohebali M, Momeni A. Leishmania and Leishmaniasis. 3th ed. Tehran: Nashre DaneshgahiCenter Press; 1994(Persian)

2. Rassi Y ,Hanafi bojd AA. Sand fly, The vector of leishmaniasis.1th ed. Tehran:Noavaran Elm publication;2006(Persian)

3. Nilforushzadeh MA Sadeghian G. Cutaneous Leishmaniasis.1th d. Tehran: Oruj publication; 2002(Persian)

4. Akhavan AA, Yaghoobi-Ershadi MR, Hasibi F, Jafari R, Abdoli H, Arandian MH, Soleimani H. Epidemiological survey in a new focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Southern Iran. In: Proceeding of 11th International Congress of Parasitology (ICOPA),Glasgow Scotland;2006

5. Killick-Kendrick R. the biology and control of Phlebotominae sand flies, Med. Vet. Entomol 1999 ; 17: 279-289.

6. Mohebali M., Javadian E., Yaghoobi-Ershadi M.R., Akhavan A.A., Hajjaran H., Abaei M.R. Characterization of Leishmania infection in rodents from endemic areas of the I.R. of Iran. East Mediterr Hlth J 2004;10: 591-9.

7. 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.

8. Yaghoobi-Ershadi MR, Hanafi-Bojd, AA, Akhavan AR, Zahrai-ramazani AR Mohebali M .Epidemiological study in a new focus of cutaneous leishmaniasis due to Leishmania major in Ardestan town, central Iran. Acta Tropica 2001;79: 115-21.

9. Rassi Y., Sofizadeh A., Abai MR., Oshaghi MA., Rafizadeh S., Mohebail M., Mohtarami F.,Salahi R. Molecular Detection of Leishmania major in the Vectors and Reservoir Hosts of Cutaneous Leishmaniasis in Kalaleh District, Golestan Province, Iran. Iranian Journal of Arthropod-Borne Diseases 2008; 2(2) : 21-27.

10. Yaghoobi-Ershsdi M.R., Akhavan AA., Mohebali M. Meriones Libycus and Rhombomys opimus (Rodentia: Gerbillidae) are the main reservoir hosts in new focus of ZCL in Iran. Trans .R .Soc .Trop .Med .Hyg 1996; 95: 503-504.

11. Aransay A.M., Scoulica E., Tselentis Y. Detection and Identification of Leishmania DNA within Naturally Infected sand Fleis by Semi-Nested PCR on Minicircle Kinetoplast DNA. Aplied and Environmental Microbiology 2000;66(5):1933-38

12. Alvar J., Baker J.R. molecular tools for epidemiological studies and diagnosis of leshmaniasis and selected other parasitic disease. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg 2002;96(Supp1.1):S1-S250.

13. Singh S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. Indian J Med Res 2006; 123: 311-30.

14. 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. Trop2005; 93(1): 75-83

15. Banuls AL, Hide M, Prugnolle F. Leishmania and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. Adv Parasitol 2007; 64: 1-109

16. Etemad E .Mammalians of Iran.Vol.1: Rodents and their identify key. Tehran: natural source protection institute publication; 1978(Persian)

17. Noyes HA., Reyburn H., Bailey J.W., 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.

18. Desjeux P. Information of the epidemiology and control of the leishmaniasis by county or terirritory.WHO;1991,91:30-47.

19. WHO.Control of leishmaniasis technical report services. Geneva:WHO;1990,18:793

20. Oshaghi MA., Ravasan NM., Javadian EA., Rassi Y., Sedaghat MM., Mohebali M., Hajjaran H. Development of species-specific PCR and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism assays for L.infantum/L.donovani discrimination. Exp Parasitol. 2009;122: 61-65

21. Oshaghi MA., Maleki Ravasan N., Javadian E., Mohebali M., Hajjaran H., Zare Z., Mohtarami F., Rassi Y. Vector Incrimination of Sand Flies in the Most Important Visceral Leishmaniasis Focus in Iran. Am. J. Trop. Med. Hyg., 81(4), 2009, pp. 572-577

22. Abai MR, Rassi Y, Imamian H , Fateh M, Mohebali M, Rafizadeh S , et al. PCR based on identification of vectors of zoonotic cutaneous Leishmaniasis in Shahrood District, Central of Iran.Pakistan Journal of Biological Science2007;10(12):2061-2065

23. Mohebali M, Javadian E, Yaghoobi-Ershadi MR, Akhavan AA, HajjaranH, Abaei MR. Characterization of Leishmania infection in rodents from endemic areas of the I.R. of Iran. East Mediterr Health J 2004;10:591-9.

24. Yaghoobi-Ershadi M.R., Jafari R., Hanafi-Bojd A.A., A new epidemic focus of zoonotic leishmaniasis in central Iran. Ann. Saudi. Med 2004;2: 98-101.

25. Islamic Republic of Iran Ministry of Heath & Medical Education. [Instruction of leishmaniasis Control]. Tehran: Center for disease control.2007:78 (Persian).

26. Yaghoobi Ershdi MR , Akhavan AA , Zahraei Ramezani AR , Javadian E, Motavalli Emami M. Field trial for the control of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Badrood, Iran.Ann Saudi Med 2000 ; 20(5-6):386-89