تعیین ناقلین لیشمانیوز جلدی به روش مولکولی PCR در روستاهای بخش مرکزی استان قم

یاور راثی[۱] ، عابدین ثقفی پور*[۲] ، محمدرضا عبا ئی[۳] ، محمدعلی عشاقی[۴]، رضا مصطفوی[۵]

۱. حشره شناس پزشکی، استاد دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۲. حشره شناس پزشکی، کارشناس ارشد مرکز بهداشت استان قم، دانشگاه علوم پزشکی قم
۳ . حشره شناس پزشکی، مربی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۴. حشره شناس پزشکی، دانشیار دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۵ . پزشک مرکز تحقیقات پزشکی ورزشی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

* نشانی برای مکاتبه: قم ، خیابان شهید لواسانی، دانشگاه علوم پزشکی قم، مرکز بهداشت استان قم abed.saghafi@yahoo.com
دریافت مقاله: دی نود پذیرش برای چاپ: اسفند نود

چکیده

سابقه و هدف: *لیشمانیوز جلدی یکی از بیماری‌های انگلی است که توسط پشه خاکی‌ها منتقل می‌شود و کانون‌هایی از بیماری در نقاط مختلف کشور وجود دارد. در استان قم این بیماری عمدتاً از بخش مرکزی شامل دهستان‌های قنوات و قمرود گزارش شده است. با توجه به اینکه آگاهی از گونه های پشه خاکی ناقل لیشمانیوز جلدی نقش اساسی در کنترل بیماری دارد. این مطالعه با هدف شناسایی ناقلین در کانون لیشمانیوز جلدی بخش مرکزی صورت گرفت.*

روش کار: *این تحقیق به روش توصیفی- مقطعی، در پنج روستای واقع در بخش مرکزی استان قم در طول سال ۱۳۸۹ انجام شد. نمونه برداری از پشه خاکی ها، هر ۱۵ روز یک‌بار از اماکن انسانی، داخلی و خارجی با نصب ۳۰۰ عدد تله چسپان انجام شد. پس از تهیه اسلاید از آنها با کلیدهای معتبر تعیین هویت شدند. به منظور تعیین ناقلین لیشمانیوز جلدی به روش مولکولی PCR ۱۸۰ عدد از پشه خاکی ها شامل: ۱۵۰عددP. papatasi ، ۲۰عدد P.sergenti ، و ۱۰عدد P. caucasicus انتخاب شدند و از آنها DNA استخراج گردید. DNA استخراج شده از پشه خاکی ها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی لیشمانیا جهت تکثیر قطعه ITS1 با روش PCR آزمایش شده اند و محصولات PCR تحت هضم آنزیمی (HaeIII) قرار گرفتند.*

یافته ها : *مجموعا" ۱۰۲۴۶ عدد پشه خاکی (۴۵۷۸ عدد از اماکن داخلی و ۵۶۶۸ از اماکن خارجی) به وسیله تله چسبان صید و تعیین هویت شد. در نتیجه ۱۰ گونه پشه‌خاکی (۵ گونه از جنس Phlebotomu و ۵ گونه از جنس Sergentomyia) در منطقه تشخیص داده شد. از ۱۸۰ پشه خاکی آزمایش شده سه پشه‌خاکی گونه P. papatasi ، آلودگی به L.major تشخیص داده شد. از این پشه ها دو تا دارای وضعیت شکمی خالی و یکی نیمه باردار بود.*

نتیجه گیری: *فلبوتوموس پاپاتاسی که در نقاط مختلف جهان و ایران ناقل لیشمانیوز جلدی روستایی بوده ؛ ناقل لیشمانیوز جلدی در بخش مرکزی استان قم محسوب می شود.*

واژگان کلیدی : ***لیشمانیوز جلدی، ناقل، PCR، قم***

مقدمه

لیشمانیوز جلدی یکی از بیماریهای انگلی شایع در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری دنیا است که عامل بیماری زای آن انگل های تک یاخته ای از جنس لیشمانیا هستند. این انگل از مخازن انسانی و حیوانی (به طور عمده جوندگان و گوشت خواران اهلی و وحشی) به وسیله گزش پشه خاکی ها از خانواده پسیکودیده، زیر خانواده فلبوتومینه، به انسان سرایت می کند(۲،۱). این بیماری در ۸۸ کشور جهان (۶۶ کشور آسیایی و آفریقایی و ۲۲ کشور در قاره های اروپا و آمریکا) در۴ قاره آندمیک است و مهم ترین بیماری مناطق حاره پس از مالاریا محسوب می شود. ۳۵۰ میلیون نفر در مناطق آندمیک بیماری زندگی می کنند که احتمال انتقال بیماری به آنها وجود دارد. سه میلیون نفر به اشکال مختلف بیماری مبتلا هستند. میزان بروز بیماری لیشمانیوز در دنیا سالانه ۱/۵ تا ۲ میلیون نفر است که از این تعداد پانصد هزار نفر مبتلا به لیشمانیوز احشایی (کالاآزار) می شوند که مرگ ۶۰ هزار نفر را بدنبال دارد. ۹۰ درصد از اشکال لیشمانیوز جلدی در کشورهای ایران، عربستان سعودی، افغانستان، سوریه، نپال و پرو رخ می دهد(۳،۴).

پشه خاکی ها زیر خانواده فلبوتومینه ناقلین مهم تک یاخته ها، باکتری ها و ویروس ها به انسان می باشند(۵). این خانواده از حشرات علاوه بر انواع لیشمانیوز جلدی، احشایی و جلدی مخاطی بیماری های دیگری نظیر بارتنولوزیس و تب پشه خاکی را نیز به انسان انتقال می دهند(۶، ۷). بیش از ۷۰۰ گونه از پشه خاکی ها در سراسر دنیا شناسایی و ثبت شده اند. در ایران ۵۲ گونه از آنها در دو جنس فلبوتوموس و سرژانتومیا شناسایی و تعیین هویت شده اند(۸). فلبوتوموس پاپاتاسی و فلبوتوموس صالحی به ترتیب ناقلین اصلی و ثانویه لیشمانیوز جلدی روستایی (ZCL) با عامل بیماریزای لیشمانیا ماژور در ایران هستند(۹،۱۰). لیشمانیوز جلدی روستایی از معضلات مهم بهداشتی ایران است. بطوریکه در بسیاری از مناطق روستایی ۱۷ استان از ۳۰ استان کشور شایع است. استان اصفهان و منطقه ترکمن صحرا از جمله مهم ترین کانون های بیماری لیشمانیوز جلدی روستایی در ایران هستند(۷،۱۱). آلودگی طبیعی *P. papatasi* به انگل *L. major* در مناطق اصفهان و شاهرود ارسنجان و نی ریز و مرودشت نیز گزارش شده است(۱۶-۱۱). در لیشمانیوز جلدی نوع شهری (ACL) فلبوتوموس سرژنتی به عنوان ناقل اصلی بیماری در ایران محسوب می شود. هم چنین در ایران چهار گونه از پشه خاکی ها، P. major, P keshishiani, P. kandellakii and P. perfiliewi در انتقال لیشمانیوز احشایی به انسان نقش دارند(۱۷ ،۶،۱۸). با این وجود لیشمانیا اینفانتوم (عامل لیشمانیوز احشایی) از فلبوتوموس الکساندری P. alexandri نیز در ایران جدا شده است(۱۹،۲۰).

با عنایت به اینکه در برنامه ریزی مبارزه با بیماری های منتقله بوسیله بندپایان اطلاع دقیق از اپیدمیولوژی بیماری نظیر عامل، ناقل بندپا و مخزن نقش تعیین کننده دارد(۲۱). هم چنین با توجه به اپیدمی لیشمانیوز جلدی در بخش مرکزی استان قم در طی سال ۸۸ (گزارش مرکز بهداشت استان قم) و هم جواری این منطقه با شهرستان کاشان که جزء کانون های آندمیک لیشمانیوز در کشور محسوب می شود و از آن جایی که تاکنون هیچ مطالعه ایی در خصوص ناقلین لیشمانیوز جلدی در روستاهای بخش مرکزی استان قم بعمل نیامده است؛ این پژوهش با هدف شناسایی ناقلین بیماری انجام شد.

روش کار

این مطالعه به صورت توصیفی - مقطعی بر روی پشه خاکی ها (ناقلین لیشمانیوزها) در طول سال ۱۳۸۹در روستاهای انتخابی از دهستان های قمرود و قنوات واقع در بخش مرکزی استان قم انجام شد. با توجه به آمار مرکز بهداشت استان قم در خصوص بالا بودن میزان بروز لیشمانیوز جلدی در بخش مرکزی استان؛ این پژوهش در پنج روستای کوه سفید، فرج‌آباد ، حسین آباد میش مست، جنت آباد و جعفرآباد مسیله انجام گرفت . صید و جمع‌آوری پشه‌خاکی‌ها با استفاده از روش تله چسپان (Sticky Trap) در روستاهای ثابت هر ۱۵ روز یک‌بار و در ۱۶ نوبت در طی ماههای فروردین، اردیبهشت، خرداد، تیر، مرداد، شهریور، مهر و آبان با نصب ۳۰۰ تله در اماکن داخلی ثابت (مکان‌های مسقف مانند: اطاق نشیمن، حمام، طویله، مرغدانی و لانه کبوترها، کاهدان) و لانه جوندگان مجاور روستاها به‌عنوان اماکن خارجی ثابت (مکان‌های فاقد سقف نظیر: حیاط، اماکن مخروبه، چپر یا حصار باغ، توده سنگ‌ها و دیواره رودخانه) صورت گرفت . نمونه‌گیری در روستاهای متغیر فقط یک‌بار در شهریور انجام شد. در کلیه موارد، یک‌ساعت قبل از غروب آفتاب به پنج روستای مورد مطالعه رفته و در هر روستا ۶۰ تله با مراجعه به ۳ واحد مسکونی از قبل تعیین شده(از حاشیه، میانه و داخل روستا) نصب می شد بطوریکه ۳۰ عدد تله چسپان در هر واحد، در داخل اتاق‌های نشیمن، خواب، راه روها، توالت، حمام، طویله و حیاط (Indoor) نصب گردید و هم زمان ۳۰ عدد تله چسپان دیگر نیز در خارج از منازل (Outdoor) جلوی اماکن مخروبه، شکاف سنگ‌ها و لانه جوندگان گذاشته شد. در تمام موارد، صبح روز بعد قبل از طلوع خورشید، تله‌های چسپان جمع‌آوری شده و جهت شناسایی و تعیین گونه به آزمایشگاه انتقال داده شد. در آزمایشگاه پشه خاکی‌ها به‌دقت با سوزن تشریح از روی تله چسبان‌ها جمع‌آوری شدند و جهت برطرف شدن روغن کرچک، پشه خاکی‌ها داخل بوته چینی حاوی استن قرار گرفتند، سپس توسط سرنگ استن را کشیده و پشه خاکی‌ها پس از چند نوبت تکرار عمل فوق، به لوله نگهداری محتوی الکل ۷۰٪ منتقل شدند. در نهایت پشه خاکی‌های کنسروشده تا زمان مونتاژ در یخچال ۴°C نگه داری شدند.

برای تشخیص و تعیین هویت پشه خاکی‌ها ابتدا از سر و دو بند انتهایی بدن آنها اسلاید میکروسکوپی تهیه گردید. بدین منظور برای برخی از نمونه‌ها از روش مونته دائم با محیط پوری (Puri-s Media) استفاده شد. پس از تهیه اسلاید میکروسکوپی از پشه‌خاکی‌ها، با استفاده از کلیدهای تشخیص پشه خاکی ، از جمله کلید تشخیص دکتر سیدی رشتی و ندیم (سال ۱۹۹۲)، ندیم و جوادیان (سال ۱۹۹۷)، Theodor (سال ۱۹۵۸) و راثی، حنفی بجد (سال ۱۳۸۵) استفاده گردید. نمونه‌ها پس از تشخیص و تعیین گونه، در جعبه جای لام نگه داری شدند. در حین کار درجه حرارت و رطوبت اماکن داخلی و خارجی ثبت می‌شد. پس از شناسایی و تشخیص گونه پشه ها از ۱۸۰ عدد پشه خاکی طبق پروتکل مربوطه، مراحل استخراج DNA (شرکت سیناژن، ایران) به انجام رسید. پس از استخراج DNA از شکم پشه ها ، برای تعیین گونه انگل از روش مولکولی PCR استفاده گردید. پرایمرهای استفاده شده شامل: LITSR(5´-CTg-gAT-CAT-TTT-CCg-AT-<g>-3´) و L5 8S (5´-TgA-TaC-CAC-TTA-TCg-CAC-T-<T>-3´) بودند(سیناژن ، ایران) .این پرایمرها بر اساس ناحیه حفاظت شده حلقه های کوچک kDNA (Minicircle) طراحی شده بود. سوش های مرجع از L. major و L. tropica به عنوان استاندارد انتخاب شدند. این سوش ها از گروه انگل شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه گردید.مقادیر مورد نیاز از پرایمرها شامل Master mix(HSPMM) به مقدار 10µl - LITSR، L5 8S، $Mgcl^2$ هر یک 1 µl و Color 2 µl و DNA به مقدار 5 µl بود. در ضمن سیکل های حرارتی در پنج مرحلهPreheating ، Denaturation، Annealing، Extension ، Final Extensionکه به ترتیب در دماهای ۹۵، ۹۴، ۴۸، ۷۲، ۷۲ و در زمان های ۵ دقیقه ، ۳۰ ثانیه ، ۳۰ ثانیه ، ۱ دقیقه ، ۷ دقیقه صورت گرفت هم چنین ۳۵ سیکل مراحل اول ، دوم ، سوم و چهارم تکرار گردید.باندهای ایجاد شده با مارکر ۵۰bp بررسی شد. و در نهایت محصولات PCR تحت هضم آنزیمی (HaeIII) قرار گرفتند.

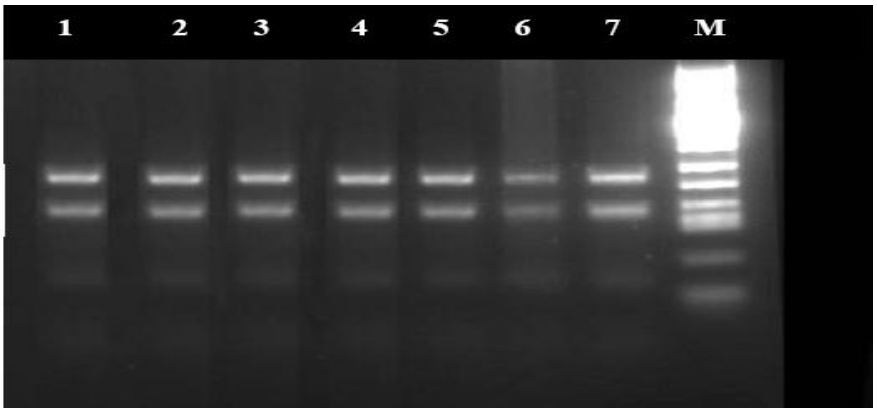
یافته ها

مجموعا" ۱۰۲۴۶ پشه خاکی (۴۵۷۸ عدد از اماکن داخلی و ۵۶۶۸ عدد از اماکن خارجی) به وسیله تله چسبان صید و تعیین هویت شد. در نتیجه ۱۰ گونه پشه‌خاکی (۵ گونه از جنس Phlebotomus و ۵ گونه از جنس Sergentomyia) در منطقه تشخیص داده شد.به منظور تعیین ناقل بیماری ، در طول نمونه برداری در فیلد از اوایل تیرماه لغایت پایان آبان ماه ۱۳۸۹ تعداد ۱۰۰ عدد پشه خاکی صید شده از اماکن داخلی و تعداد ۸۰ عدد پشه خاکی صید شده از اماکن خارجی مورد آزمایش PCR قرار گرفت.از این تعداد ۱۵۰ عدد پشه خاکی P.papatasi ۲۰، عدد P.sergenti و ۱۰ P.cucasicus group بودند. نتایج حاصل از انجام آزمایش PCR نشان داد که تعداد ۳ عدد از پشه خاکی های گونه فلبوتوموس پاپاتاسی (معادل ۲٪) ؛ دارای آلودگی لپتومونائی بودند و باند های مشاهده شده بعد از انجام الکتروفورز ۳۵۰ bp بودکه نشان دهنده آلودگی به انگل L.major است. انگل لیشمانیا ماژور از بدن پشه‌خاکی های فلبوتوموس پاپاتاسی ماده با وضعیت شکمی خالی و نیمه باردار جداسازی شد(جدول ۱). ۳۰ و ۷۰ درصد پشه خاکی های صید شده از اماکن داخلی و لانه جوندگان، صید شده در مرداد و شهریور ماه، دارای آلودگی بودند(شکل ۱ و ۲) .

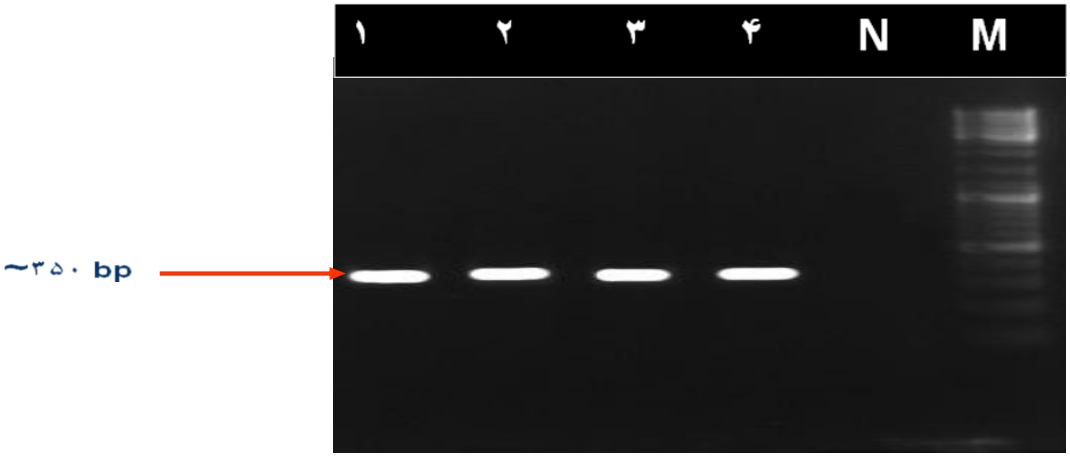
جدول ۱: نسبت آلودگی به L.major با روش PCR در پشه خاکی های صید شده از بخش مرکزی، استان قم، ۱۳۸۹

وضعیت شکمی گونه	حالات شکمی پشه خاکی های آزمایش شده					تعداد پشه خاکی ها مثبت به L.major	نسبت آلودگی پشه خاکی ها (٪) به انگل L.major
	خالی	خونخورده	نیمه باردار	باردار	جمع		
P.papatasi	۹۰	۳۰	۱۰	۲۰	۱۵۰	۳	٪۲
P.sergenti	۱۰	۱۰	.	.	۲۰	۰	۰
P.caucasicus group	۱۰	.	.	.	۱۰	۰	۰
جمع کل	۱۱۰	۴۰	۱۰	۲۰	۱۸۰	۳	٪۱/۷

شکل ۱: نتایج باند های حاصل از تکثیر DNA انگل لیشمانیا ماژور با پرایمرهایITS1 (باندهای های ۱-۳ : نمونه های پشه خاکی های آلوده ، باند ۴ : لیشمانیا ماژور استاندارد، N: کنترل منفی ، M: مارکر)



شکل ۲ : الکتروفورز الکتروفورز محصول PCR مولکول kDNA انگل L.major در پشه خاکی ها به روش RFLP (باندهای های ۱-۶ : نمونه های گرفته شده پشه خاکی های آلوده ، باند ۷ : لیشمانیا ماژور استاندارد، M: مارکر)



بحث

این پژوهش با استفاده از روش مولکولی PCR اولین تلاش جهت ردیابی انگل لیشمانیا در ناقلین احتمالی لیشمانیوز جلدی در استان قم می باشد . مهم ترین یافته این تحقیق اثبات فلبوتوموس پاپاتاسی به عنوان ناقل بیماری در کانون های مناطق روستایی بخش مرکزی استان می باشد. در این مطالعه ۲ درصد پشه خاکی های گونه فلبوتوموس پاپاتاسی با وضعیت شکمی خالی و نیمه باردار دارای آلودگی لپتومونایی بودند.از نظر مطالعات اپیدمیولوژیکی جدا کردن انگل از بدن پشه‌خاکی های با وضعیت شکمی خالی در اثبات یک گونه پشه‌خاکی به عنوان ناقل قطعی بسیار کمک کننده است ؛ زیرا این امر نشان می دهد که پشه خاکی ، خون خواری کرده و خون در بدنش هضم شده است و در نتیجه تخم گذاری کرده و هم اکنون با وضعیت شکمی خالی، آلوده به انگل لیشمانیا است؛ هم زمان با هضم خون انگل نیز مراحل رشد و نمو خود را طی کرده و به فرم آلوده کننده تبدیل شده است که این پشه‌خاکی در گزش‌های بعدی می تواند انگل را به میزبان های دیگر انتقال داده و آنها را به بیماری مبتلا سازد. کثیری و جوادیان در مطالعه ای در شهرستان چابهار آلودگی لپتومونایی در نزد فلبوتوموس صالحی را برای اولین بار از ایران و در نزد فلبوتوموس پاپاتاسی برای اولین بار از استان سیستان و بلوچستان گزارش نمودند. بر اساس تحقیق مذکور از تعداد ۶۶۷ فلبوتوموس پاپاتاسی و ۴۶۵ فلبوتوموس صالحی تشریح شده به ترتیب ۱۴ (۲/۱درصد) و ۵ (۱/۰۷ درصد) مورد دارای آلودگی لپتومونایی بودند(۲۲). در حال حاضر کانون های مهم لیشمانیوز جلدی روستایی شامل اصفهان، سرخس، ترکمن صحرا، لطف آباد، اسفراین، طبس، جاجرم، برداسکن در استان خراسان ، دزفول ، دهلران، شوشتر، موسیان، عین خوش، دشت عباس، دشت آزادگان، فکه، اهواز، آبادان در استان خوزستان ، اصطهبان ارسنجان و نی ریز و مرو دشت در استان فارس، دامغان، شاهرود، بکران شاهرود در استان سمنان، بوشهر، ابردژ ورامین، دشتیاری، کاشان، اردستان، بادرود، چاه افضل، چاهک (یزد) ، بم و مهران می باشد و آلودگی طبیعی *P. papatasi* به انگل *L. major* از این مناطق گزارش شده است(۱۶-۱۱). در ضمن پشه‌خاکی‌های آلوده در مرداد و شهریور ماه از اماکن داخلی و لانه جوندگان صید شده بودند نتایج این مطالعه شبیه اطلاعات بدست آمده در مناطق اصفهان، بادرود، نطنز، نیک آباد، اردستان، دامغان و ترکمن صحرا می باشد(۱۱ ،۲۳). در تحقیق حاضر فلبوتوموس پاپاتاسی با ۶۸/۷ درصد کل نمونه های صید شده گونه غالب بود.این گونه از اماکن داخلی و لانه جوندگان صید شد. صید فلبوتوموس پاپاتاسی از اماکن داخلی نشان دهنده عادت رفتاری آندوفیل بودن این پشه است(۲۴). در مطالعه عزیزی و همکاران در شهرستان نورآباد ممسنی فلبوتوموس پاپاتاسی با ۲۴/۲ در صد کل نمونه های جمع آوری شده گونه غالب معرفی شد(۲۵). در مطالعه آقایی افشار و همکاران در شهرستان بافت، فلبوتوموس پاپاتاسی با ۳۳/۷۴ درصد گونه غالب بود(۲۶). در شهرستان کلاله نیز فلبوتوموس پاپاتاسی ۴۱/۲ درصد پشه خاکی های صید شده را تشکیل داد و گونه غالب بود(۷). در شهرستان دامغان ۴۶/۷درصد از پشه خاکی ها ، فلبوتوموس پاپاتاسی بود(۲۷). انگل جدا شده از پشه های فلبوتوموس پاپاتاسی لیشمانیا ماژور بود و نتیجه آزمایش PCR این یافته را تایید نمود . این انگل عامل لیشمانیوز جلدی نوع روستایی بوده که ناقل اصلی آن فلبوتوموس پاپاتاسی و مخازن آن جوندگان صحرایی است(۶،۲۲). در مطالعات انجام شده در کلاله و دامغان نیز ناقل بودن فلبوتوموس پاپاتاسی به روش PCR به اثبات رسیده است(۷ ،۲۳).

نتیجه گیری

فلبوتوموس پاپاتاسی که در نقاط مختلف جهان و ایران ناقل لیشمانیوز جلدی روستایی بوده ؛ ناقل لیشمانیوز جلدی دراین منطقه محسوب می شود. استفاده از توری ها و پرده‌ها در درب و پنجره منازل به همراه استفاده از پشه‌بند آغشته به سم، نقش زیادی در کاهش میزان بروز بیماری دارد. زیرا با توجه به نیمه اهلی بودن پشه خاکی‌های گونه *P. papatasi* احتمال ورود پشه‌ها را به اماکن مسکونی کاهش می دهد. پیشنهاد می گردد در آینده در زمینه تعیین ارتباط میزان بروز بیماری با شرایط آب و هوایی و تست های حساسیت پشه‌خاکی‌ها منطقه در برابر سموم مختلف و رایج مطالعاتی صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

نگارندگان بر خود لازم می دانند از همکاری جناب آقای دکتر محمدیان ریاست مرکز بهداشت استان، آقای دکتر باقر محمودی مدیر گروه مبارزه با بیماریهای استان قم برای همکاری در اجرای این طرح تشکر نمایند.

REFERENCES

1. Markle WH, Makhoul K. Cutaneous leishmaniasis: Recognition and treatment. Am Fam Physician 2004; 69(6):1455-60.

2.Forouzani A. Study of Phlebotomianae sand flies and sensitivity of Phlebotomus papatasi to DDT 4%. Iran South Med J 1997; 1: 16-22.

3. Ashford RW. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. Clin Dermatol 1996; 14(5): 523-532.

4. Desjeux P. Leishmaniasis. Nat Rev Microbiol 2004;2(9): 692.

5. Endris RG, Young DG, Perkins PV. Experimental transmission of Leishmania mexicana by a North American sand fly, Lutzomyia anthophora (Diptera: Psychodidae). J Med Entomol 1987; 24(2): 243-7.

6. Rassi Y, Hanafi Bojed A. [Sandflies, Leishmaniasis vectors] 1st. Tehran: Noavarane Eilm Publication. 2006; 2, pp 156. [Persian]

7.Sofizadeh A, Rassi Y, Abbasi M. Ecological characters of Leishmaniasis vectors in Kalaleh district, Golestan Province, Iran 2006-2007, J Gorgan Uni Med Sci 2007; 31: 81-5 .

8. Kasiri H, Javadian E, Seyedi-Rashti MA. Liste des Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) d'lran. Bull Soc Pathol Exot2000; 93(2):129-30.

9. 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: 518–9.

10. Yaghoobi-Ershadi MR, Javadian E. Seasonal variation of Leishmania major infection rates in sandflies from rodent burrows in Isfahan province, Iran. Med Vet Entomol 1996; 10: 181–4.

11.Soufizadeh A. Study on Vectors & Reservoirs of Cutaneous Leishmaniasis in Kalaleh District, Gorgan Province. (MSc Thesis). Tehran Uni Med Sci 2008. [Text in Persian]

12. Yaghoobi-Ershadi, M.R., Javadian, E. and Gh. Tahvildare-Biruni (1995). Leishmania major Mon-26 isolated from naturally infected Phlebotomus papatasi (Diptera: Psycodidae) in Isfahan province, Iran. Act. Trop. 59: 279-282.

13. Abai M R, Rassi Y et al.(2007). PCR based on identification of vectors of zoonototic cutaneous leishmaniasis in Shahrood district, central of Iran. Pakistan J of Biological Sciences.10:122061-65.

14. Rassi y,Javadian E,jalali M,Motazedian Mh,Vatndoost H.Investigation on zoonotic cutaneous leishmaniasis,southern Iran.Iranian J. Publ. Health, 2004; 33(1): 33-35.

15. Rassi Y et al.(2008). Molecular study on vectors and reservoir hosts of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Central of Iran. Bull Soc Pathol Exot(Inpress).

16. Rassi Y, Ghassemi MM, Javadian E, Motazedian H, Rafizadeh S, Aghaie Afshar A, Rafinejad J, Jalali M. Determination of Reservoir(s) and Vector(s) of Cutaneous Leishmaniasis by Nested-PCR in Marvdasht District, Fars Province, Southern Iran. East Med Hlth J, 2007; 13, 689-90.

17. Seyedi-Rashti MA, Keighobadi K, Nadim A. Urban cutaneous leishmaniasis in Kerman, southeast Iran. Bull Soc Pathol Exot 1984; 77: 312–9.

18. Oshaghi MA, Rasolian M, Shirzadi MR, Mohtarami F, Doosti S. First report on isolation of Leishmania tropica from sandflies of a classical urban cutaneous leishmaniasis focus in southern Iran. Exp Parasitol 2010; 126(4): 445–50.

19. Azizi K, Rassi Y, Javadian E, Motazedian MH, Rafizadeh S, Yaghoobi-Ershadi MR, Mohebali M. Phlebotomus (Paraphlebotomus) alexandri: a probable vector of Leishmania infantum in Iran. Ann Trop Med Parasitol 2006; 100(1): 63–8.

20. Azizi K, Rassi Y, Javadian E, Motazedian MH, Asgari Q, Yaghoobi-Ershadi MR. First detection of Leishmania infantumin Phlebotomus (Larroussius) major (Diptera: Psychodidae) from Iran. J Med Entomol 2008; 45(4): 726–31.

21. Foroozani A , Khajeian A et al. Fauna and monthly activity of sand flies at zoonotic cutaneous leishmanianisis focus in Bushehr city, Iran South Med J 2011; 14: 31-40.

22. Kassiri H, Javadian E. [A report on the natural leptomonad infection of Phlebotoms papatasi and Phlebotomus salehi in Sistan- Baluchistan province (South East of Iran] Persian. Iran J Publ Health 2000; 29(1-4): 15-20.

23 .Rassi Y, Oshaghi MA, Mohammadi Azani S, Abaie MR, Rafizadeh S, et al . Molecular Detection of Leishmania Infection Due to Leishmania major and Leishmania turanica in the Vectors and Reservoir Host in Iran. Vector-Borne and Zoonotic Dis J. 2011; 11(2): 145- 50

24.Ardahali S, Rezaei H. and Nadim A. Leishmania and Leishmaniasis.2thed.Tehran: Tehran university publication center. 1994 (Persian).

25. Azizi K, Rassi Y, Javadian E, et al. [The fauna and bioecology of vectors of Leishmaniasis (phlebotominae sand flies) in Nourabad Mamassani country, Fars province] Persian. J Armaghan Danesh 2008; 13(3): 101-110.

26. Aghaie AA, Rasi Y, Ebaie MR and Aghaie AM. [Determination of fauna and monthly activity of sand flies in the south of Baft district, Kerman province in 2004] Persian. J Kerman Univ Med Sci 2005; 12(2): 136-141.

27. Mohamadi- Azni S, Rassi Y, Oshaghi MA, et al. Fauna and monthly activity of sand flies at zoonotic cutaneous leishmanianisis focus in Damghan, Semnan (2008). J Semnan Univ Med Sci 2009; 11(2):107-113