تعیین هویت انگلهای لیشمانیای جدا شده از بیماران مبتلا به کالاآزار با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در استان کهگیلویه و بویراحمد

دکتر بهادر سرکاری [*]

مهدی فخار [**]

دکتر صدیقه ابراهیمی [***]

دکتر محمدحسین معتضدیان [****]

دکتر غلامرضا حاتم [****]

محسن کلانتری [*****]

حسن رضانژاد [******]

[*] دکترای ایمونولوژی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی

[**] دانشجوی دکترای انگل شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی، بخش انگل شناسی

[***] متخصص اطفال، استادیار دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، دانشکده پزشکی، گروه اطفال

[****] دکترای انگل شناسی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی

[*****] کارشناس ارشد حشره شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی

[******] کارشناس ارشد انگل شناسی، شیراز، بیمارستان شهید بهشتی، آزمایشگاه

تاریخ وصول :۱۳۸۵/۱/۲۲

تاریخ پذیرش:۱۳۸۵/۵/۲

مؤلف مسئول : دکتر بهادر سرکاری

پست الکترونیک : sarkarib@yahoo.com

چکیده:

مقدمه و هدف: لیشمانیوز احشایی بیماریی است که با نام کالاآزار معروف می‌باشد و بـــه وسیله گونه‌های لیشمانیای دونوانی، اینفانتوم و شاگاسی ایجـــاد می شود. لیشمانیوز احشایی در بیشتر مناطق ایران به صورت اسپورادیک و در مناطقی از استانهای اردبیل و آذربایجان شرقی، فارس، بوشهر و قم به صورت آندمیک دیده می شود. مطالعات انجام شده مشخص نموده کـــه لیشمانیوز احشایی در بعضی از مناطق استان کهگیلویه و بویراحمد وجود دارد. این مطالعه با هدف بررسی خصوصیات عامل ایجاد کننده لیشمانیوز احشایی در این استان انجام گرفته است.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی از ٦ بیمار مبتلا بـه کـالا آزار بـستری شـده در بخـش اطفـال بیمارستان امام سجاد (ع) یاسـوج در سـال ١٣٨٤ نمونـه مغـز اسـتخوان تهیـه گردیـد. از اسـلایدهای میکروسکوپی تهیه شده از این نمونه‌ها دی ان آ استخراج گردید و سپس جهت تعیـین گونـه انگـل بـا روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز سمی نستد مورد بررسی قرار گرفتند. جهت ایـن کـار بـا اسـتفاده از پرایمر $LINR_4$ و LIN_{17} قطعه متغیر از حلقه های کوچک دی ان آ کینتوپلاستی انگل لیـشمانیا در یـک مرحله تکثیر گردید. محصول به دست آمده بـر روی ژل آگـاروز ١/٥ درصـد الکتروفـورز شـده و بـا اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی گردید. سـپس از ژل حـاوی بانـدها عکـسبرداری گردیـد و بـا توجـه بـه شاخص وزنی، گونه انگل مشخص گردید.

یافته ها: با بررسی اسمیرهای مستقیم مغز استخوان، اماستیگوت‌های انگل (اجسام لیشمن) به تعداد نسبتاً فراوان در نمونه‌های تهیه شده مشاهده شد و در دو مورد از بیماران، انگل پس از یک هفته در محیط دو فازی ان ان رشد نموده و سپس در محیط های تک فازی $RPMI_{1640}$ و سرم جنین گوساله به مدت سه هفته انبوه‌سازی شد. نمونه حاصل از تمامی بیماران مورد مطالعه در آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ایجاد باندی به اندازه ٧٢٠ جفت باز نمود. مقایسه این باندها با باندهای حاصل از گونه‌های استاندارد، مشخص نمود که گونه انگل در تمامی بیماران مورد مطالعه لیشمانیا اینفانتوم می‌باشد.

نتیجه گیری: عامل مولد لیشمانیوز احـشایی (کـالاآزار) در منطقـه مـورد مطالعـه لیـشمانیا اینفـانتوم می باشد. ضروری است مطالعات جامع در خصوص مخازن این بیماری در این استان انجام گیرد تـا به همراه بررسی‌های سرواپیدمیولوژیک جنبه‌های مختلف این بیماری مشخص گردد.

واژه های کلیدی: لیشمانیا، کالاآزار، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز سمی نستد

مقدمه

لیشمانیازیس در برگیرنده طیف وسیعی از بیماری‌ها از ضایعه جلدی تا لیشمانیوز احشایی کشنده می‌باشد که به وسیله گونه‌های انگل لیشمانیا ایجاد می‌شود. تظاهرات بالینی بیماری به سه فرم جلدی، جلدی مخاطی و احشایی می‌باشد. لیشمانیوز احشایی فرم سیستمیک بیماری است که با نام کالاآزار معروف می باشد و به وسیله گونه‌های لیشمانیای دونوانی[۱]، اینفانتوم[۲] و شاگاسی[۳] ایجاد می شود. لیشمانیوز احشایی در بیشتر مناطق ایران به صورت اسپورادیک (تک گیر) و در مناطقی از استانهای اردبیل (مشکین شهر و دشت مغان) و آذربایجان شرقی (اهر و کلیبر)، فارس (فیروز آباد و جهرم) و بوشهر (برازجان و خورموج) و قم (بخش خلجستان) به صورت آندمیک دیده می‌شود. مخازن بیماری سگ و سگ سانان (روباه و شغال) و ناقلین آن را گونه‌های مختلف پشه خاکی تشکیل می‌دهند. این بیماری در ایران اغلب در کودکان زیر ده سال (۹۸ درصد) دیده می‌شود و بیشتر بین روستاییان شایع بوده و به طور کلی بیشترین موارد بیماری مربوط به عشایر استان‌های مختلف کشور می‌باشد. این بیماری طیف وسیعی از علایم را به دنبال 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(۲-۱).

در مطالعه انجام شده به وسیله نیازی و نیک‌نفس (۱۳۷۹) بر روی پرونده‌های بیمارستانی در بیمارستانهای شهر یاسوج مشخص گردید که لیشمانیوز احشایی به طور اسپورادیک در مناطق مختلف استان کهگیلویه و بویراحمد وجود دارد. در این مطالعه مشخص گردید که طی یک دوره چهار ساله (۱۳۷۸-۱۳۷۵) تعداد ۵۷ بیمار با تشخیص بیماری کالاآزار در بخش اطفال بیمارستانهای شهر یاسوج بستری گردیده‌اند که بیشترین موارد بیماری در شهر یاسوج و موارد بعدی از مناطق لوداب، زیلایی، دهدشت، دشتروم، مادوان، مارگون، سرآبتاوه، سپیدار و فیروز آباد بوده است (۳).

تاکنون مطالعه‌ای که تعیین کننده عوامل مولد لیشمانیوز احشایی در استان کهگیلویه و بویراحمد باشد صورت نگرفته است. در مطالعه حاضر برای اولین بار انگل لیشمانیای جدا شده از بیماران مبتلا به لیشمانیوز احشایی در استان کهگیلویه و بویراحمد به کمک روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز سمی نستد[۴] تعیین هویت گردیده است.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی، ۶ بیمار مبتلا به کالاآزار مراجعه کننده به بخش اطفال بیمارستان امام سجاد (ع) شهر یاسوج در سال ۱۳۸۴، ابتدا به وسیله پزشک متخصص کودکان از نظر معاینات بالینی مورد

1-Leishmania donovani
2-Leishmania infantum
3-Leishmania chagasi
4-Semi – Nested Polymerase Chain Reaction (PCR)

بررسی قرار گرفتند و پس از مشکوک شدن به این بیماری سونوگرافی شکم، آزمایش‌های شمارش کامل سلولهای خونی[1] ، ادرار و سرولوژی به منظور 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. در مورد کشت انگل نیز ۲ تا ۳ قطره از مایع آسپیراسیون مغز استخوان را در شرایط استریل وارد محیط دو فازی ان ان ان و ان اس[2] نموده، به مدت ۴ هفته در دمای ۲۶-۲۴ درجه سانتی گراد انکوبه گردید.

از میان ۶ بیمار مورد مطالعه، سه بیمار دارای جنس مذکر و سه بیمار دیگر مؤنث بودند. این بیماران ساکن روستاهای مختلف استان از جمله روستای چات باریک دشت روم و چین لوداب بودند. میانگین گروه سنی آنها ۲۰ ماه بوده است.

جهت استخراج دی ان آ[3] برای تعیین گونه انگل در بیماران مذکور، از روش وینسی و همکاران[4] استفاده گردید(۴). در این روش جهت استخراج دی ان آ اسلایدهای رنگ‌آمیزی شده مغز استخوان مربوط به بیماران مبتلا به کالاآزار مورد استفاده قرار گرفت، بدین ترتیب که ابتدا سطح لام‌های میکروسکوپی با تیغ سترون جراحی تراشیده شده، ماده به دست آمده در لوله‌های اپندورف یک و نیم سی‌سی ریخته شد. به هر لوله ۲۰۰ میکرولیتر بافر (PH=8,1% V/V:Tween 20 1mM, EDTA 50 mM, Tris-HCL 1mM). دارای پروتئیناز کا[5] (۸/۵ میکرولیتر از محلول ۱۹ میلی‌گرم در لیتر) افزوده گردید. لوله‌ها به مدت یک شب در درون انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد در آزمایشگاه نگهداری شدند. سپس به هر لوله ۲۰۰ میکرولیتر محلول فنل، کلروفرم و ایزوآمیل الکل افزوده گردید. پس از آن لوله ها را با دستگاه ورتکس[6] به مدت یک دقیقه به هم زده و بعد به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۶۰۰۰ سانتریفوژ شدند. مایع رویی هر لوله که حاوی دی ان آ بود به لوله اپندورف تمیز دیگری منتقل شده و با افزودن الکل اتیلیک خالص به میزان ۴۰۰ میکرولیتر و قرار گرفتن در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد و سانتریفوژ در دور ۱۰۰۰۰ به مدت ده دقیقه، دی ان آ رسوب کرده، آن را در دمای اتاق و یا انکوباتور ۳۷ درجه خشک نموده و پس از حل نمودن آن در آب مقطر استریل، جهت آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مورد استفاده قرار گرفت.

با استفاده از پرایمر $LINR_4$ و LIN_{17} قطعه متغیر از حلقه های کوچک[7] دی ان آ کینتوپلاستی انگل لیشمانیا در یک مرحله تکثیر گردید (۶ و۵). مواد

1-Cell Blood Count (CBC)
2-NNN+NS
3-DNA
4-Vince et al
5-Proteinase K
6-Vortex
7-Minicircles

لازم برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز جهت نمونه به حجم ۲۵ میکرولیتر به این قرار بود؛ تک دی ان آ پلی‌مراز[1] (سیناژن - ایران) یک واحد، بازهای دی‌اکسی‌نوکلئوتید[2] ۲/۵ میلی‌مول، کلرید منیزیم[3] ۲ میلی‌مول، بافر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (سیناژن - ایران) ۲/۵ میکرولیتر، ۴۰ نانوگرم از پرایمرهای $LINR_4$ (5-GGGGTTGGTGTAAAATAGGG-3) و LIN_{17}(5-TTTGAACGATTTCTG-3) که به این مجموعه ۵ میکرولیتر از دی ان آ مورد نظر افزوده گردید. سپس نمونه‌های آماده شده در دستگاه ترموسایکلر (تیچن و کمبریج[4] ساخت انگلستان) با برنامه زیر قرار داده شدند؛ در مرحله اول، دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه در یک مرحله، در مرحله دوم؛ ۱- دمای ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۲- دمای ۵۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۳- دمای ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه که مرحله دوم، ۳۰ بار تکرار گردید. در مرحله سوم، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه در یک مرحله بود.

پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، محصول به دست آمده بر روی ژل آگاروز ۱/۵ 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 گردید.

یافته ها

علایم بالینی مشاهده شده در این بیماران شامل هپاتواسپلنومگالی و تب طولانی مدت می باشد. عمده ترین شکایت بیماران درد شکم، تب بالا و کاهش اشتها بوده است. آزمایش‌های خون شناسی نشان دهنده کم‌خونی، ترومبوسیتوپنی، لکوپنی، هیپرگاماگلوبولینمی و هیپوآلبومینمی (بر عکس شدن نسبت آلبومین به گلوبولین سرم) و طبیعی بودن آزمون‌های عملکرد کبد[5] بوده است. در آزمایش های سرولوژی بیماران از آزمون ایمونوفلورسانس غیرمستقیم[6] استفاده شد. در این آزمون تیتر آنتی‌بادی ۱:۱۲۸ و بالاتر به عنوان تیتر مثبت در نظر گرفته می‌شود که تمامی بیماران مذکور دارای عیار آنتی‌بادی ضدلیشمانیایی احشایی برابر ۱:۱۲۸ و بالاتر بودند که از نظر سرولوژی مثبت هستند. با بررسی اسمیرهای مستقیم مغز استخوان، اماستیگوت‌های انگل (اجسام لیشمن) به تعداد نسبتاً فراوان مشاهده شد و در دو مورد از بیماران، انگل پس از یک هفته در محیط دو فازی ان ان ان رشد نمود و سپس در محیط های تک فازی سرم جنین گوساله[7] ۱۰ درصد و $RPMI_{1640}$ به مدت سه هفته انبوه‌سازی

1-Taq DNA Polymerase
2-dNTP
3-Mg Cl_2
4-Techen, Cambridge
5-Liver Function Test (LFT)
6-Indirect Flourescent Antibody Test (IFAT)
7-Fetal Calf Serum (FCS)

شد. جداسازی انگل از بیماران مبتلا به کالاآزار برای اولین بار در استان کهگیلویه و بویراحمد انجام گرفت که هم اکنون انگل های مذکور در تانک ازت به صورت کرایو نگهداری می گردند.

برای تعیین گونه انگل در روش واکنش زنجیره ای پلی‌مراز باند حاصل برای لیشمانیا اینفانتوم ۷۲۰ جفت باز، لیشمانیا تروپیکا[1] ۷۶۰ جفت باز و برای لیشمانیا ماژور[2] ۶۵۰ جفت باز می‌باشد. تمامی نمونه‌های جدا شده از بیماران مبتلا به کالاآزار مورد مطالعه در آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز باند ۷۶۰ جفت باز ایجاد نمودند. مقایسه باندهای حاصل از نمونه‌های جدا شده این بیماران با گونه‌های استاندارد، مشخص نمود که گونه انگل مولد لیشمانیوز احشایی در تمامی بیماران مورد مطالعه لیشمانیا اینفانتوم می‌باشد.

بحث و نتیجه گیری

به طور کلی تشخیص هویت انگل های مولد لیشمانیوز احشایی از اهمیت خاصی برخوردار است چرا که از یک طرف با افزایش موارد ابتلا به بیماری ایدز در کشور های جهان سوم و در حال توسعه الگوی بالینی بیماری پیچیده تر شده است و از طرف دیگر گزارشهای متعددی از پتانسیل ایجاد عفونت احشایی به وسیله سوش های انگل لیشمانیا تروپیکا در انسان از هند، عراق، خلیج فارس (سربازان آمریکایی در جنگ خلیج) و استان فارس باعث ایجاد نگرانیهایی در خصوص اپیدمیولوژی این بیماری گردیده است(۷).

در مطالعه حاضر مشخصات عامل مولد بیماری کالاآزار در استان کهگیلویه و بویراحمد به کمک روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تعیین گردید. جهت تعیین گونه انگل‌های لیشمانیا، روشهای مختلف مولکولی و بیوشیمیایی به کار گرفته شده اند که در این بین روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به دلیل آن که مستقیماً بر ژنوم انگل تأکید دارد و امروزه طبقه‌بندی موجودات مختلف بر پایه خصوصیات ژنتیک آنها تعریف می شود، دارای ارزش ویژه‌ای است. از مزایای انجام روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در تشخیص کالا آزار می‌توان به تشخیص زودرس، حساسیت و ویژگی بالا، عدم نیاز به کشت انگل و استفاده از اسلایدهای بایگانی شده بیماران اشاره نمود. تاکنون روش‌های واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به کار گرفته شده انواع مختلفی از دی ان آ لیشمانیایی را جهت تکثیر مورد هدف قرار داده اند، اما بر اساس تحقیقات انجام شده به نظر می رسد از بهترین این اهداف که می تواند بیشترین حساسیت و ویژگی را فراهم نماید تکثیر حلقه‌های کوچک دی ان آ کینتوپلاستی لیشمانیا باشد (۸). از حلقه های کوچک در هر سلول انگل لیشمانیا تعداد فراوانی کپی (۱۰هزار کپی) موجود بوده و طول متوسط هر یک بین ۷۰۰ تا

1-Leishmania tropica
2-Leishmania major

۱۰۰۰ جفت نوکلئوتید می‌باشد. هر حلقه کوچک از دو قطعه ثابت و متغیر تشکیل یافته که سکانس قطعه ثابت در گونه‌های مختلف لیشمانیا یکسان بوده، 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 جدا سازی نمود که پرایمرهای $LINR_4$ و LIN_{17} به کار رفته در این تحقیق تأمین کننده چنین هدفی خواهد بود(۹).

نتایج مطالعه حاضر روشن نمود که عامل مولد بیماری کالاآزار در منطقه مورد مطالعه لیشمانیا اینفانتوم می‌باشد. عامل مولد لیشمانیوز احشایی در مطالعات انجام شده در سایر مناطق ایران نیز لیشمانیا اینفانتوم گزارش گردیده است. در مطالعه مظلومی و همکاران (۱۳۸۳) در شمال غرب ایران از ۲۱ نمونه جداشده از بیماران مبتلا به کالاآزار، انگل مورد نظر در تمامی موارد لیشمانیا اینفانتوم گزارش گردید(۱۰). در مطالعه محبعلی و همکاران (۲۰۰۱) در استان بوشهر لیشمانیا اینفانتوم از سگ و شغال (مخازن کالاآزار) جدا گردید(۲). در مطالعه اسفندیاری و همکاران (۱۳۸۰) بر روی لامهای بیوپسی مغز استخوان تهیه شده از مناطق مختلف استان فارس، با روش سمی نستد واکنش زنجیره ای پلی‌مراز در بیش از ۹۷ درصد موارد عامل مولد بیماری لیشمانیا اینفانتوم و در دو مورد لیشمانیا تروپیکا گزارش گردیده است(۱۱).

در مجموع نتایج این مطالعه برای اولین بار مشخص نمود که عامل مولد کالاآزار در این استان لیشمانیا اینفانتوم می باشد. پیشنهاد می‌گردد مطالعات جامع در خصوص مخازن این بیماری انجام گیرد تا به همراه بررسی‌های سرواپیدمیولوژیک جنبه‌های مختلف این بیماری در استان مشخص گردد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از دکتر مهدی کرمیان به خاطر راهنمایی‌های لازم در انجام روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و پروانه حبیبی به خاطر همکاری در کشت انگل و شهین ارشادی به خاطر تایپ این مقاله کمال تشکر را داریم.

Characterization of Leishmania Parasites Isolated From Kala- azar Patients in Kohgiloyeh and Boyerahmad, Using Semi-Nested PCR

Sarkari B[*], Fakhar M[**], Ebrahimi S[***], Motazedian MH[****], Hatam GH[****], Kalantari M[***], Rezanejad H[*****].

*Assistant Professor of Immunology, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

**PhD Candidate in Parasitology, Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

*** Assistant Professor of Pediatrics, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Yasuj University of Medical Sciences , Yasuj, Iran

****Associate Professor of Parasitology, Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

*****MSc of Entomology, Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

******MSc of Parasitology, Shaheed Beheshti Hospital, Shiraz, Iran

KEYWORDS:
Leishmania,
Kala azar,
Semi-nested PCR

Received:22/1/1385
Accepted:2/5/1385

Corresponding author:Sarkari B
Email:sarkarib@yahoo.com

ABSTRACT:

Introduction & Objective: Visceral leishmaniasis (VL) is a disease commonly known as Kala-azar caused by protozoan parasites of the genus Leishmania including L. donovani, L. infantum and L. chagasi. VL is sporadic in many areas of Iran and is endemic in a few provinces such as Fars, Azarbayjan, Bushehr, Ardabil and Qom. VL has been reported from some areas of Kohgiloyeh and Boyerahmad and this study aimed to characterize the causative agent of VL in this region.

Materials & Methods: Bone marrow sample was obtained from 6 VL patients from children department in Imam Sajad hospital in Yasuj. DNA was extracted from the obtained samples and was checked by semi-nested PCR to determine the species of the parasite. To do that, a segment of minicircle kinetoplast DNA was amplified, using LINR4 and LIN17 primers. Products of PCR were evaluated by electrophoresis, using 1.5% agarose and stained with ethidium bromide.

Results: Parasitologically examination of bone marrow smears demonstrated amastigotes form of the parasite in the samples. For mass cultivation, isolated parasites were cultured in diphasic NNN followed by RPMI 1640 media. All the samples produced a 720 bp band in PCR assay. The isolates were compared with referent strains and it was revealed that all the isolates were L. infantum.

Conclusion: Findings of this study demonstrated that the causative agent of VL in Kohgiloyeh and Boyerahmad was L. infantum. Further study is needed to explore other aspects of VL in this region.

REFERENCES:

۱. فخار مهدی، محبعلی مهدی، بارانی محمد. معرفی یک کانون آندمیک کالاآزار در استان قم و بررسی سرواپیدمیولوژی عفونت لیشمانیایی احشایی در انسان و مخازن حیوانی (سگ) این منطقه. مجله ارمغان دانش دانشگاه علوم پزشکی یاسوج ۱۳۸۳؛ سال نهم، شماره ۳۳: ۵۲-۴۳.

2.Mohebali M, Hamzavi Y, Edrissian GH, Forouzani A. Seroepidemiological study of visceral leishmaniasis among humans and animal reservoirs in Bushehr province, Islamic Republic of Iran. East Mediterr Health J 2001; 7(6): 912-7.

۳. نیازی شمسی، نیک‌نفس فرزانه. علایم بالینی و توزیع جغرافیایی بیماری کالاآزار در بیماران بستری شده در بخش اطفال بیمارستان شهید بهشتی یاسوج در سالهای ۱۳۷۸-۱۳۷۵. پایان نامه دکترای عمومی پزشکی. یاسوج: دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی، ۱۳۷۹.

4.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: 349-531.

5.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: 2877-88.

6.Aransay AM, Scoulica E, Tselentis R. Detection and identification of leishmania DNA within naturally infected sand flies using semi nested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. Appl Environ Microbiol 2002; 66: 1933–8.

7.Hyams KC, Riddle J, Trump DH, Graham JT. Endemic infectious diseases and biological warfare during the Gulf War: a decade of analysis and final concerns. Am J Trop Med Hyg 2001; 65(5): 664-70.

8.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: 613-7.

9.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: 31–4.

۱۰. مظلومی عبدالصمد، اسماعیلی حیدر، دیوس کلایو. شناسایی گونه و زیرگونه‌های لیشمانیاهای جدا شده از بیماران کالاآزار در شمال غرب ایران. مجله پزشکی ارومیه ۱۳۸۳؛ دوره ۱۵، شماره ۱: ۴۶-۳۹.

۱۱. اسفندیاری فریده. بررسی گذشته نگر تشخیص لیشمانیوز احشایی به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی. پایان نامه دوره کارشناسی ارشد انگل شناسی، شیراز: دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی، ۱۳۸۱.