

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

عابدین ثقفی پور^{۱*}، یاور راثی^۲، محمدرضا عبایی^۳، محمدعلی عشاقی^۴، بابک فرزین نیا^۵، رضا مصطفوی^۶، مهدی نوروزی^۷

چکیده

زمینه و هدف: لیشمانیوز جلدی در بسیاری از مناطق ایران به عنوان یک معضل عمده بهداشتی محسوب می شود، و کانون های آن نیز در نقاط مختلف کشور وجود دارد. این مطالعه به منظور بررسی ترکیب گونه های مخازن احتمالی بیماری در کانون لیشمانیوز جلدی در روستاهای منتخب بخش مرکزی استان قم انجام شد.

روش بررسی: این مطالعه به صورت توصیفی - مقطعی بر روی جوندگان (مخازن احتمالی لیشمانیوزها) در سال ۱۳۸۹ در روستاهای انتخابی از دهستان قمرود و قنات واقع در بخش مرکزی استان قم انجام شد. در این پژوهش جمعاً ۴۶ سر پستاندار کوچک از ۵ روستای مورد نظر با استفاده از تله های زنده گیر صید شد. اسمیر تهیه شده از لاله گوش یا زخم های مشکوک روی پوست پس از رنگ آمیزی با گیمسا، از نظر وجود اجسام لیشمن مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه، بعد از استخراج DNA از اسمیرهای مثبت؛ با استفاده از روش PCR گونه انگل تعیین شد.

یافته ها: در مجموع ۴۶ سر پستاندار کوچک صید شد، که با استفاده از کلید معتبر تعیین هویت شدند. از این تعداد ۳۱ جوندۀ *Meriones libycus* (٪۶۷/۴)، ۸ جوندۀ *Nesokia indica* (٪۱۷/۴) و ۴ جوندۀ *Allactaga elater* (٪۸/۷)، ۲ جوندۀ *Mus musculus* (٪۴/۳) و ۱ جوندۀ *Hemiechinus auritus* (٪۲/۷) را شامل می شد. نتایج PCR نشان داد یک سر *M. libycus* (٪۳/۷) از جوندگان متعلق به گونه *M. libycus* آلوده به انگل *Leishmania major* بوده است.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد لیشمانیوز جلدی شایع در بخش مرکزی استان قم از نوع روستایی بوده و مخزن آن نیز گونه ای از جوندگان صحرائی است. بنابراین، مشخص شدن نوع بیماری و مخزن آن می تواند به مسئولین بهداشتی کمک کند تا راهکارهای مناسب را برای پیشگیری و کنترل آن در منطقه اتخاذ نمایند.

کلید واژه ها: لیشمانیوز جلدی؛ لیشمانیوز جلدی منتشره؛ واکنش زنجیره ای پلیمرز؛ قم، ایران.

^۱ کارشناس ارشد حشره شناسی پزشکی، مرکز بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.
^۲ استاد حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
^۳ مربی حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
^۴ دانشیار حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
^۵ مربی حشره شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.
^۶ پزشک عمومی، مرکز بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.
^۷ کارشناس ارشد اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول مکاتبات:

عابدین ثقفی پور، مرکز بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:

abed.saghafi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۰/۴/۲۸

تاریخ پذیرش: ۹۰/۷/۱

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Saghafipour A, Rassi Y, Abai MR, Oshaghi MA, Farzinnia B, Mostafavi R, Noroozi M. Determination of Reservoirs of Cutaneous Leishmaniasis by PCR Molecular Method in the Villages of Central County of Qom Province. Qom Univ Med Sci J 2013;7(1):18-23. [Full Text in Persian]

مقدمه

لیشمانیوز مهم‌ترین بیماری منتقله از بندپایان به انسان است که از معضلات مهم بهداشتی در بسیاری از نقاط دنیا محسوب می‌شود و به صورت ضایعات پوستی (سالک)، احشایی (کالاآزار)، و مخاطی - پوستی بروز می‌کند. هرساله تعداد زیادی از ساکنین مناطق آندمیک به این بیماری مبتلا می‌شوند (۲،۱). لیشمانیوز در ۸۸ کشور دنیا مشاهده شده است که ۸۲٪ (۷۲ کشور) جزء کشورهای در حال توسعه می‌باشند.

سالهای عمر مفید از دست رفته به علت ناتوانی‌های ناشی از لیشمانیوز (DALY Disability-Adjusted Life Years) در حدود ۲/۴ میلیون سال است. حدود ۱/۵-۱ میلیون نفر در جهان به لیشمانیوز جلدی مبتلا بوده و سالانه ۵۰۰ هزار مورد جدید نیز از نوع احشایی بیماری بروز می‌کند. همچنین جمعیتی حدود ۳۵۰ میلیون نفر در دنیا، در معرض خطر ابتلا به این بیماری قرار دارند (۴،۳). ۹۰٪ موارد لیشمانیوز جلدی فقط در ۷ کشور جهان شامل افغانستان، الجزایر، برزیل، ایران، پرو، عربستان سعودی و سوریه اتفاق می‌افتد که ایران و عربستان سعودی بیشترین میزان شیوع بیماری را به خود اختصاص داده‌اند (۴،۳).

در حال حاضر، لیشمانیوز جلدی روستایی در بسیاری از مناطق روستایی ۱۷ استان از ۳۰ استان کشور شایع است. استان اصفهان و منطقه ترکمن صحرا نیز از جمله مهم‌ترین کانون‌های بیماری لیشمانیوز جلدی روستایی در ایران هستند (۵،۱). عامل بیماری‌زای لیشمانیوز، نوعی تک‌یاخته به نام لیشمانیا *Leishmania* از راسته کیتوپلاست‌داران است که بر حسب محیط زندگی خود به دو شکل بدون تاژک (آماستیگوت یا جسم لیمن) و تاژک‌دار (پروماستیگوت) دیده می‌شود. لیشمانیوزها عموماً توسط گونه‌های پشه خاکی منتقل می‌شوند (۷،۶،۱).

ناقل بیماری پشه خاکی‌ها از جنس *فلبوتوموس (فلبوتوموس پاپاتاسی)* در لیشمانیوز جلدی نوع روستایی و *فلبوتوموس سرژنتی* در نوع شهری است (۸). مخزن اصلی بیماری در مناطق مرکزی ایران (اصفهان) جونده *Rhombomys opimus* در غرب و جنوب غربی کشور *Tatera indica* می‌باشد که *Meriones libycus* به عنوان مخزن ثانویه در حفظ و نگهداری این بیماری نقش دارد (۱۱،۹).

همچنین در شمال و شمال شرق کشور و در مناطق نزدیک جنوب تهران نیز *Rhombomys opimus* مخزن اصلی سالک مرطوب بوده است (۱۵،۱۲). براساس گزارش‌های مرکز مدیریت بیماری‌ها؛ تعداد مبتلایان به انواع مختلف لیشمانیوزها در کشور سالیانه حدود ۲۰۰۰۰ نفر می‌باشد، ولی بدون شک ارقام واقعی بیماری ۴-۵ مرتبه بیشتر از ارقام ثبت شده است. لیشمانیوز جلدی به دو شکل لیشمانیوز جلدی روستایی یا مرطوب و لیشمانیوز جلدی شهری یا خشک دیده می‌شود که هر دو نوع آن در ایران وجود دارد. لیشمانیوز جلدی شهری در شهرهای بزرگ نظیر تهران، مشهد، شیراز، کرمان، یزد، نیشابور، سبزوار، اصفهان، قم، کاشان، زاهدان و میرجاوه شایع است. گسترش سریع شهرها، احداث اماکن مسکونی بر روی کلونی جوندگان، تغییرات محیط زیست بر اثر حرکات جمعیت، سدسازی، قطع برنامه‌های سمپاشی بر علیه ناقلین مالاریا در بسیاری از مناطق، ورود و خروج افغانه و بالاخره مشکلات ناشی از افزایش سریع جمعیت و به طور کلی تغییرات اجتماعی - اقتصادی سبب شده است که امروزه لیشمانیوز به عنوان یک مشکل بهداشتی مهم در کشور مطرح باشد (۲) (۱۶-۱۸). بنا به گزارش مرکز بهداشت استان قم از سال ۱۳۷۷ همه ساله تعداد زیادی (حدود ۲۰۰ مورد) از موارد ابتلا به لیشمانیوز جلدی در بخش مرکزی شهرستان قم از دهستان‌های قمرود و حاجی‌آباد گزارش شده است. تخمین زده می‌شود که تعداد موارد واقعی چند برابر موارد ثبت شده است. محل سکونت اکثر این مبتلایان روستاهای کوه سفید، فرج‌آباد، مشک‌آباد، جعفرآباد مسیله، صیدآباد، حسین‌آباد میش‌مست و جنت‌آباد واقع در بخش مرکزی استان بوده که در ۳۰-۵۰ کیلومتری شمال شرقی شهر قم قرار دارند. با توجه به اپیدمی بیماری لیشمانیوز جلدی در منطقه قمرود (۱۶۹ مورد بروز بیماری) از بخش مرکزی استان قم در سال ۱۳۸۸ و همجواری این منطقه با مناطق بادرود (امامزاده آقاعلی عباس (ع) و کاشان که جزء کانون‌های فعال لیشمانیوز جلدی در کشور محسوب می‌شوند و از آنجایی که تاکنون هیچ‌گونه مطالعه‌ای در خصوص تعیین مخزن یا مخازن احتمالی بیماری لیشمانیوز جلدی در بخش مرکزی به عمل نیامده است، این تحقیق با هدف شناسایی مخازن این بیماری صورت گرفت.

روش بررسی

این مطالعه به صورت توصیفی - مقطعی بر روی جوندگان (مخازن لیشمانیوزها) در طول سالهای ۱۳۸۸-۱۳۸۹ در روستاهای انتخابی از دهستان‌های قمروود و قنوت 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 ۵ روستای کوه سفید، فرج‌آباد، حسین‌آباد میش‌مست، جنت‌آباد و جعفرآباد مسیله انجام گرفت. در این منطقه هوا در طول تابستان گرم (حدود ۴۸°C) و در زمستان سرد است، و شغل اغلب مردم این منطقه نیز دامپروری و کشاورزی است. در این مطالعه تعداد ۴۶ سر پستاندار کوچک طی ماه‌های پاییز و زمستان سال ۱۳۸۸، بهار و تابستان سال ۱۳۸۹ با استفاده از تله‌های زنده‌گیر جمع‌آوری شد. هر ماه ۲ بار و در هر دفعه ۳۰ عدد تله زنده‌گیر در نزدیکی لانه‌های فعال جوندگان کار گذاشته شد. در این تله‌ها از خیار، گوجه، سوسیس، گردوی بوداده و هویج به‌عنوان طعمه استفاده شد. تله‌ها معمولاً از غروب آفتاب نصب شده و تا روز بعد قبل از گرم شدن هوا جمع‌آوری می‌شدند. جوندگان صیدشده جهت تهیه اسمیر به آزمایشگاه دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران انتقال داده شدند. در ادامه، از قسمت لاله گوش و یا زخم‌های مشکوک روی پوست نمونه‌های جمع‌آوری‌شده، اسمیر تهیه شد که پس از رنگ‌آمیزی با گیمسا از نظر وجود اجسام لیشمن به‌وسیله میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. جهت شناسایی جوندگان از کلید تشخیص جوندگان دکتر اعتماد استفاده شد (۱۹). در مرحله بعد، لام‌های میکروسکوپی تهیه‌شده از لاله گوش جوندگان را با چاقو تراشیده و عمل جداسازی DNA از روی لام‌ها، طبق پروتکل مربوط به مراحل استخراج DNA (شرکت سیناژن، ایران) انجام شد. پس از استخراج DNA از اسمیرهای مثبت اماستیگوت موجود در روی لام‌ها، برای تعیین گونه انگل از روش مولکولی PCR استفاده شد. پرایمرهای استفاده‌شده شامل:

L5 8S (5'-TgA-TaC-CAC-TTA-TCg-CAC-T-<T>-3')

LITSR (5'-CTg-gAT-CAT-TTT-CCg-AT-<g>-3') بودند

(سیناژن، ایران). این پرایمرها براساس ناحیه حفاظت‌شده

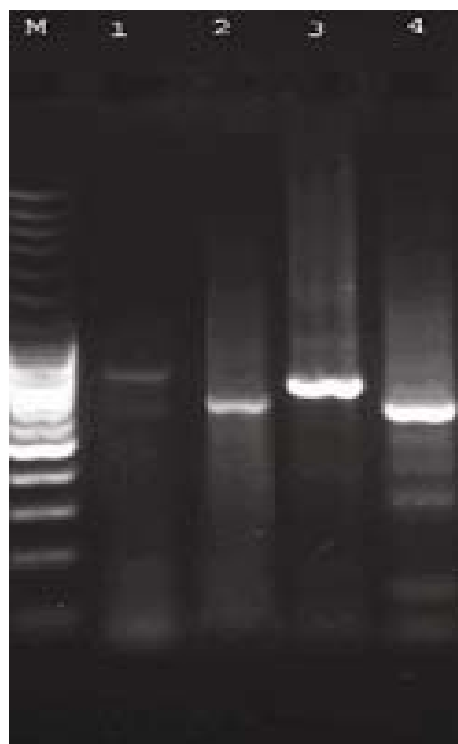
حلقه‌های کوچک kDNA (Minicircle) طراحی شده بود. سوش‌های مرجع از *L. major* و *L. tropica* به‌عنوان استاندارد انتخاب شدند. این سوش‌ها از گروه انگل‌شناسی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه شده بود. مقادیر مورد نیاز از پرایمرها عبارت بودند از: Master mix (HSPMM) به مقدار ۱۰ μl، L5 8S، LITSR - ۱ μl، MgCl₂ هر یک ۱ μl و ۲ μl Color و DNA به مقدار ۵ μl. در ضمن، سیکل‌های حرارتی در پنج مرحله Preheating، Denaturation، Annealing، Extension، Final Extension به ترتیب در دماهای ۹۵°C، ۹۴°C، ۴۸°C، ۷۲°C و در زمانهای ۵ دقیقه، ۳۰ ثانیه، ۳۰ ثانیه، ۱ دقیقه، ۷ دقیقه صورت گرفت. همچنین ۳۵ سیکل مراحل اول، دوم، سوم و چهارم تکرار شد. باندهای ایجادشده با ماکر ۵۰ bp بررسی شدند.

یافته‌ها

در طی ۱۲ ماه مطالعه، از نیمه دوم فروردین تا نیمه دوم اسفندماه جمعاً ۴۶ سر پستاندار کوچک از کلونی‌های جوندگان در مجاورت روستاهای تحت مطالعه صید و تعیین گونه شد. از این تعداد ۳۱ جونده (۶۷/۴٪) متعلق به گونه *Meriones libycus*، ۸ جونده (۱۷/۴٪) *Allactaga elater*، ۴ جونده (۸/۷٪) *Mus musculus*، ۲ جونده (۴/۳٪) *Nesokia indica* و یک پستاندار کوچک (۲/۷٪) به نام *Hemiechinus auritus* بود. پس از بررسی اسمیرهای میکروسکوپی و انجام آزمایش PCR بر روی نمونه‌ها، در یک سر از جونده‌های گونه *M. libycus* (۳/۷٪) به‌طور طبیعی آلودگی به *L. major* مشاهده شد و در سایر پستانداران کوچک صیدشده آلودگی دیده نشد. این اولین گزارش در مورد ردیابی انگل به‌وسیله آزمایشهای مولکولی PCR در گونه *M. libycus* به‌عنوان مخزن اصلی بیماری لیشمانیوز جلدی در منطقه بود (شکل). در ضمن از ۱۵ نفر از بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی ساکن در روستاهای انتخابی لام میکروسکوپی تهیه شد، سپس با مشاهده اجسام لیشمن، آزمایش PCR صورت گرفت که در آنها نیز آلودگی به *L. major* دیده شد.

مثل اوایل غروب آفتاب و صبح، قبل از اینکه هوا گرم شود. همچنین در تمام ماه‌های سال این جونده فعال است، اما در ماه‌های فصل تابستان و پاییز فعال‌تر می‌شود. *M. libycus* از کشورهای عربستان سعودی و ازبکستان، به‌عنوان مخزن لیشمانیوز جلدی روستایی گزارش شده است (۲۵،۲۶). این گونه پراکنش وسیعی در مناطق مرکزی و جنوبی ایران دارد (۷،۶) (۱۸-۱۶) (۲۱،۲۲،۲۵،۲۶). مطالعات راثی و همکاران در سه کانون مهم استان فارس شامل ارسنجان، نیریز و مرودشت حاکی از تغییرات وضعیت مخازن این بیماری بوده است، به‌طوری‌که در این سه کانون برای اولین بار جونده *Meriones libycus* به‌عنوان مخزن اصلی بیماری گزارش شده است. همچنین کانون‌های دیگری که در آن *M. libycus* نقش مخزن لیشمانیوز جلدی را بازی کند، در حال شکل‌گیری است که از جنوب استان اصفهان شروع و تا استان فارس ادامه دارد (۱۶،۲۵). در این کانون‌ها گونه *Phlebotomus papatasi* به‌عنوان ناقل قطعی بیماری تعیین شده است (۲۰،۲۱،۲۵،۲۶).

شایان ذکر است که *N. indica* نیز می‌تواند به‌طور تصادفی در سیکل انتقال بیماری قرار گیرد و به انگل *L. major* آلوده شود (۲۷). تاکنون آلودگی این جونده از مناطق خوزستان (۷٪) و اردستان گزارش شده است (۲۷،۲۸). در این مطالعه در روستاهای مورد بررسی، تنها ۲ سر جونده نر و یکا ایندیکا (*N. indica*) صید شد که هر دو فاقد آلودگی به انگل لیشمانیا بودند. همچنین جونده دیگری به نام *Allactaga elater* بررسی شد. این جونده کوچکترین و معمولی‌ترین موش دوپا بوده که در ایران نیز دیده شده است، و از انواع دیگر *Allactaga* به‌وسیله گوش نسبتاً کوچکتری که دارد تشخیص داده می‌شود. تاکنون موش دوپای کوچک از استان فارس، خوزستان، کرمان، بلوچستان، کردستان و آذربایجان نیز گزارش شده است (۱۹). در مطالعه حاضر این جونده (*Allactaga elater*) از بخش مرکزی استان قم صید شد، که آلودگی لیشمانیایی از آن جداسازی نشد. همچنین در این مطالعه موش خانگی یا *Mus musculus* نیز صید شد. این گونه تقریباً در همه نقاط ایران به استثنای قسمت‌های کاملاً خشک و نامناسب برای زندگی مانند (کویر نمک و دشت لوت) وجود دارد، و به‌طور نیمه اهلی در مجاورت انسان به‌صورت اجتماعات



شکل: نتایج حاصل از تکثیر DNA اتکل *L. major* با پرایمرهای ITS1 از نمونه *M. libycus* آلوده
1. (Negative Control), 2. (*L. major* Standard),
3. (*L. infantum* Standard), 4. (Sample isolated from
M. libycus), M (Marker)

بحث

در این پژوهش با استفاده از روش مولکولی PCR، اولین تلاش جهت ردیابی انگل *L. major* در مخازن احتمالی لیشمانیوز جلدی در استان قم صورت گرفت. مهم‌ترین یافته این تحقیق، اثبات جونده گونه *M. libycus* به‌عنوان مخزن بیماری در کانون‌های مناطق روستایی بخش مرکزی استان بود. این گونه از دیگر کانون‌ها نظیر بادرود، مرودشت، ارسنجان، نیریز، خاتم و بافق به‌عنوان مخزن اصلی نیز گزارش شده است (۷) (۱۸-۱۶) (۲۰،۲۱). در مناطق مرکزی و شمال شرقی ایران، کانون‌هایی مانند اصفهان، اردستان، برخوار و ارزوئیه که ژربیل بزرگ (*R. opimus*) نقش مخزن اصلی را دارد، همچنین در غرب و جنوب‌غربی ایران که ژربیل هندی (*T. indica*) مخزن اصلی است؛ *M. libycus* به‌عنوان مخزن ثانویه ایفای نقش می‌کند (۶،۱۶،۲۳،۲۴). در منطقه مورد بررسی این جونده بیشتر فعالیت روزانه داشت؛ البته در ساعاتی که درجه حرارت هوا مناسب باشد

کاملاً وحشی زندگی می کند (۱۹). در این مطالعه هیچ یک از موش های خانگی صید شده آلوده به انگل لیشمانیا نبودند.

نتیجه گیری

در این بررسی با توجه به نتایج به دست آمده از PCR، در حدود ۳/۷٪ از جوندگان گونه *M. libycus* به طور طبیعی آلوده به انگل لیشمانیا مازور بودند، که این گونه جوندگانه به عنوان مخزن اصلی لیشمانیوز جلدی در استان قم مطرح است. با توجه به اینکه جوندگان، مخزن لیشمانیوز جلدی روستایی بوده و مخازن لیشمانیوز جلدی نوع شهری نیز انسان و سگ می باشد، لذا این یافته نشان داد لیشمانیوز جلدی شایع در بخش مرکزی استان قم می تواند از نوع روستایی باشد. بنابراین، مسئولین بهداشتی منطقه بایستی از راهکار جوندگه کشی برای کنترل بیماری استفاده کنند.

همچنین پیشنهاد می گردد به منظور کنترل بیماری و کاهش میزان بروز آن در سالهای آتی، برنامه جوندگه کشی و مبارزه با جوندگان در اولویت برنامه ریزان بهداشتی استان قرار گیرد. از طرفی، آموزش بهداشت برای تمام گروه های در معرض خطر ساکن در روستاهای آندمیک بیماری نیز می تواند در زمینه پیشگیری از بیماری بسیار مؤثر باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب طرح مصوب دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران با (کد ۶۱۶۸) و همکاری مرکز بهداشت استان، همچنین دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی قم انجام شده است. بدین وسیله از زحمات جناب آقای دکتر مجید محمدیان، ریاست محترم مرکز بهداشت استان قم که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند، تقدیر و تشکر می گردد.

References:

1. Ardahali S, Rezaei H, Nadim A. Leishmania and Leishmaniasis. 2nd ed. Tehran: Tehran Uneversity Publication Center; 1994. [Text in Persian]
2. Nadim A, Javadian E, Mohebbali M, Zamen- moemeni A. Leishmania and Leishmaniasis. 3rd ed. Tehran: Tehran Uneversity Publication Center 2008. [Text in Persian]
3. World Health Organization. Disease Watch Focus: Leishmaniasis. The Unicef-Unpd World Bank-Who Special Program. TDR Nature Rewies Microbiology Disease Watch 2004 Sep; 2:692-693.
4. Leishmaniasis and Leishmania/HIV Co-Infection. WHO Reports on Global Surveillance of Epidemic-prone Infectious Disease. WHO/CDS/ISR/; 2000. p. 121-127.
5. Yaghoobi-Ershadi MR, Javadian E. Studies on Sand Flies in a Hyperendemic Area of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis Iran. Indian J Med Res 1997;105:61-66.
6. Yaghoobi-Ershadi MR, Hanafi bojd AA, Zahraei Ramezani AR, Mohebbali M. Cutaneous Leishmaniasis in Ardestan, Iran. Hakim Med J 1998;3:207-214. [Full Text in Persian]
7. Yaghoobi-Ershadi 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):386-389.
8. Nilforushzadeh MA, Sadeghian G. Cutaneous Leishmaniasis. Tehran: Oruj Publication; 2002. [Text in Persian]
9. Javadian E, Rassi Y. The Susceptibility to 4% Ddt and Host Preference of the Probable Vectors of Visceral Leishmaniasis in North West of Iran. Iranian J Pub Health 1998;27(1-2):47-54.
10. 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):140-143.

11. Nadim A, Faghhih 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.
12. Seyedi-Rashti MA, Nadim A. Epidemiology of Cutaneous Leishmaniasis in Iran. B Khorassan Area, Part I: The Reservoirs. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 1967;60(6):510-518.
13. Nadim A, Seyedi-Rashti MA, Mesghali A. Epidemiology of Cutaneous Leishmaniasis in Turkeman Sahra, Iran. *J Tropical Medicine and Hygiene* 1968;71(9):238-239.
14. Javadian E, Nadim A, Tahvildare-Bidrui Gh, Assefi V. Epidemiology of Cutaneous Leishmaniasis in Iran. B Khorassan Area, Part V: Report on a Focus of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis In Esferayen. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 1976;69(2):140-143. [Full Text in Persian]
15. Seyedi-Rashti MA, Salehzadeh A. A New Focus of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis Near Tehran. *Sci J Hamadan Univ Med Sci* 1996;4(1). [Full Text in Persian]
16. 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 ed. International Meeting on Microbial Epidemiological Markers (IMMEM6) 2003;102(178):27-30. Les Diablerets Switzerland.
17. Yaghoobi-Ershadi MR. The Epidemiology of Cutaneous Leishmaniasis: A New Focus of Khatam City, Yazd Province. *J Yazd Univ Med Sci* 2008;15(4):47-52. [Full Text in Persian]
18. Jafari R, Mohebbali M, Dehghan Dehnavi A, Soleimani H, Akhavan A, Hajaran H. The Epidemiology of Cutaneous Leishmaniasis in Bafgh City Yazd Province 2005 *J Yazd University of Medical Sciences* 2007;15(2):76-83. [Full Text in Persian]
19. Etemad A. Mammals of Iran. (Rodents and Identification Key), Publication of National Society for Environmental Conversation 1978;6:89-96. [Full Text in Persian]
20. Rassi Y, Jalali M, Javadian Ex, Motazedian MH. Confirmation of *Meriones Libycus* (Rodentia; Gerbillidae) as the Main Reservoir Host of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis in Arsanjan, Fars Province, South of Iran (1999-2000). *Iranina J Public Hleath* 2001;30(3-4):143-144.
21. Rassi y, Javadian E, Jalali M, Motazedian Mh, Vatndoost H: Investigation on Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis, Southern Iran. *Iranian J Public Health* 2004;33(1):31-35.
22. Abai MR, Rassi Y, et al. PCR Based on Identification of Vectors of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis in Shahrood District, Central of Iran. *Pak J Biol Sci* 2007;10(12):2061-65.
23. Yaghoobi-Ershadi MR. Study of Current Statue of Cutaneous Leishmaniasis Epidemiology in Parts of Isfahan Focuses for Design and Proposal Control Program. Medical Entomology. [PhD Thesis]. Health School, Tehran University of Medical Sciences; 1994. [Text in Persian]
24. Hassibi F. The Epidemiologic Assessment of Cutaneous Leishmaniasis in Arzooye, Baft County, Kerman Province During Thesis for Master Degree of Health Sciences in Medical Entomology and Vector Controlling, Faculty of Health, Tehran University of Medical Sciences; 2004. [Text in Persian]
25. Rassi Y, et al. *Meriones Libycus* Is the Main Reservoir of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis in South Islamic Republic Iran. *East Mediterr Health J* 2006;12:(3-4):474-7.
26. Rassi Y, et al. Vectors and Reservoirs of Cutaneous Leishmaniasis in Marvdasht District, Southern Islamic Republic of Iran. *East Mediterr Health J* 2007;13(3):686-692.
27. Javadian E. Study Statue of Cutaneous Leishmaniasis in Khoozestan Province. Assessment of Reservoir of. [MSc Thesis]. Health School, Tehran University of Medical Sciences; 1970. [Text in Persian]
28. Javadian E, Seyedi-Rashti MA, Yaghoobi-Ershadi MR. The Focus of Rural Cutaneous Leishmaniasis by Focus with Zoonotic Reservoirs in Iran. Survey of Leishmaniasis in Iran Seminar. Research of Baghiatallah University of Medical Sciences 1990. [Text in Persian]