بررسی و مقایسه ایمونوگلبولین های تام سرم و آنتی بادی های اختصاصی ضدلیشمانیاماژور در بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی نوع خود شفا و مزمن

نویسندگان: مینا کیوانجاه [۱]، دکترمحمد حسین علیمحمدیان [۲]، دکتر عارف امیرخانی [۳]، آمینا کریمی نیا [۴]

۱) کارشناس آزمایشگاه بخش ایمونولوژی انستیتو پاستور ایران
۲) استادیار و رئیس بخش ایمونولوژی انستیتو پاستور ایران
۳) استادیار و رئیس بخش اپیدمیولوژی انستیتو پاستور ایران
۴) محقق و عضو هیات علمی بخش ایمونولوژی انستیتوپاستور ایران

چکیده:

این بررسی به منظور مطالعه تغییرات ایمونوگلبولین های تام سرم و تعیین عیار آنتی بادی های اختصاصی ضدلیشمانیا در بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی نوع خود شفا Self - healing و مزمن Non - healing انجام شده است.

در این مطالعه سی و یک مورد افراد Self - healing و سی و سه مورد افراد Non - healing در مقایسه با سی مورد افراد نرمال مورد بررسی قرار گرفتند. برای تعیین میزان ایمونوگلبولین های سرم (IgG, IgM, IgA) از روش رادیال ایمونودیفوزیون (RID) و برای تعیین عیار آنتی بادی های اختصاصی ضدلیشمانیا از دسته IgM و IgG از روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم استفاده گردید.

همچنین سرم بیماران و افراد نرمال از نظر میزان درصد پروتئین های خون با روش الکتروفورز بررسی شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که ایمونوگلبولین های سرم درد و گروه بیماران با گروه کنترل تفاوت محسوسی نشان نمی دهد ولی عیار آنتی بادی اختصاصی ضد لیشمانیا (IgG) در بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی نوع Self - healing نسبت به افراد نرمال تفاوت چشم گیری دارد و در مورد IgM اختصاصی، بین گروه نرمال و دو گروه Non - healing , Self - healing تفاوت معنی داری دیده می شود.

❑ مقدمه:

انگل تک یاخته ای لیشمانیا عامل طیف وسیعی از بیماریها از جمله لیشمانیوز جلدی، جلدی مخاطی و احشائی در انسان می باشد. اشکال بالینی ناشی از انگل های لیشمانیا طیفی از فرم های بهبود یابنده لیشمانیوز جلدی (بصورت خودبخود) تا فرم های کشنده و منتشر را شامل می شود [۱]. در ایران دو گونه لیشمانیا بنام های لیشمانیا ماژور و لیشمانیا تروپیکا عامل لیشمانیوز جلدی مرطوب و خشک هستند [۲,۳,۴].

مخزن وحشی انگل جوندگان و ناقل آن پشه خاکی (فلبوتوموس) می باشد [۵,۶]. لیشمانیوز جلدی یکی از

بیماریهای بومی شایع در ایران است، علی رغم این که بروز این بیماری با بهبودی و ایجاد ایمنی نسبت به آلودگی مجدد همراه است اما در تعدادی از افراد، بیماری به شکل مزمن یا Non - healing درمی آید [۸،۷]. مطالعات گذشته نقش سیستم ایمنی بخصوص ایمنی سلولی را در رابطه با لیشمانیوز بطور واضح

شکل ۱ : بیمار مبتلا به سالک با زخم روی بینی

نشان داده و مطالعات زیادی نیز در زمینه تغییرات سیستم ایمنی هومورال انجام گرفته [۷،۶،۵] ولیکن در لیشمانیوز جلدی مطالعات در زمینه سیستم ایمنی هومورال بندرت انجام شده است. بررسی های بعمل آمده حاکی از ایجاد و افزایش ایمونوگلبولین ها در بیماریهای ناشی از گونه های لیشمانیا از قبیل لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا دونوانی می باشد. ولی در لیشمانیوز جلدی مقایسه بین اشکال خود شفا و مزمن تاکنون انجام نشده است [۱۴،۱۳،۱۲،۱۱،۱۰،۹].

هدف از این مطالعه بررسی و مقایسه تغییرات ایمونوگلبولین های سرم بطور کلی و بررسی آنتی بادی های اختصاصی ضدلیشمانیا خصوصاً در بیماران مبتلابه لیشمانیوز جلدی نوع Self - healing و Non - healing و مقایسه آنها با یکدیگر و موارد نرمال است. این بررسی جهت ارزشیابی نقش ایمنی هومورال در این بیماران می تواند ارزشمند باشد.

❐ مواد و روشها:

الف – نمونه گیری:

در این طرح ۳۱ مورد افراد خود شفا (افرادی که پس از ابتلاء به بیماری در طی مدت دو سال یا کمتر بطور خودبخود یا تحت اثر دارو بهبود می یابند) و سی و سه مورد افراد غیر خود شفا (افرادی که علیرغم درمان و پس از گذشت دو سال یا بیشتر بهبود نیافته و بیماری در آنها بصورت مزمن درمی آید) و سی مورد افراد سالم مورد بررسی قرار گرفت.

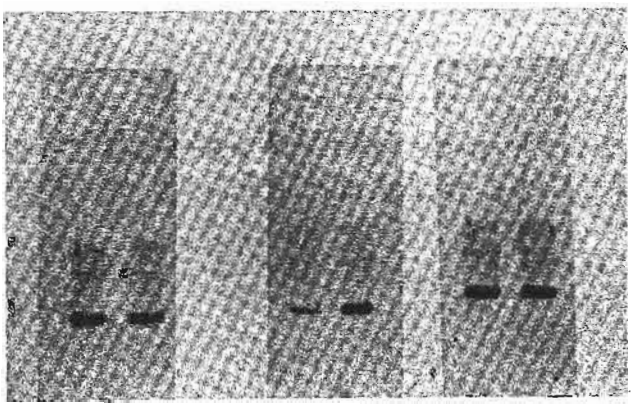
نمونه خون بیماران به روش استاندارد تهیه و سرم آنها پس از جداسازی در فریزر ۷۰ – درجه سانتی گراد تا زمان انجام آزمایش نگهداری گردید. در پرسشنامه خصوصیات بیماران از قبیل سن، شغل، تاریخ ابتلاء، نوع درمان، ابتلایا عدم ابتلا به بیماریهای سل و جذام مشخص و تکمیل گردید.

ب – بررسی وضعیت پروتئین ها و ایمونوگلبولین های سرم

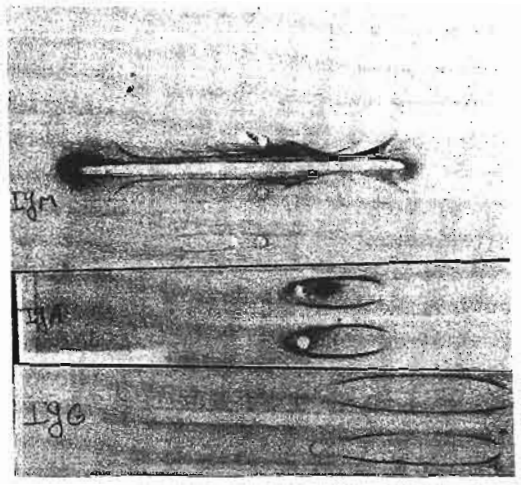
ب – ۱ : تعیین درصد پروتئین های سرم با روش الکتروفورز

الکتروفورز نمونه های سرم با استفاده از پلاکهای استات سلولز و دستگاه میلی پور برای تعیین درصد پروتئین های سرم انجام گرفت.

ب – ۲ : بررسی کیفی ایمونوگلبولین های سرم با روش ایمونوالکتروفورز



شکل ۲ : باندهای مربوط به پروتئین های سرم پس از الکتروفورز



شکل ۳ : باندهای IgG ، IgA و IgM پس از ایمونوالکتروفورز

ایمونوالکتروفورز نمونه‌ها به روش Grabar & williams (۱۹۵۳) (۱۵) انجام شد.

ب – ۳: تعیین میزان ایمونوگلبولین‌های سرم با روش رادیال ایمونودیفوزیون

سنجش ایمونوگلبولین‌های IgG, IgM, IgA در سرم خون افراد با استفاده از روش RID (Fahey & Mancini) [۱۶, ۱۷, ۱۸, ۱۹, ۲۰] انجام شد. بدین منظور از پلیت‌های آماده حاوی ژل آنتی بادی (مونووالان) بهرنیگ استفاده گردید. نمونه‌های سرم و همچنین استاندارد در حفره‌های موجود در پلیت قرار داده شد و پس از ۲۴ تا ۷۲ ساعت قطر دایره‌های رسوبی اندازه گیری و پس از رسم منحنی استاندارد مقادیر ایمونوگلبولین‌ها تعیین شد.

ب – ۴ : سنجش آنتی بادی‌های اختصاصی ضدلیشمانیا به روش ایمونوفلورسانس

سرم بیماران مورد مطالعه برای تعیین آنتی بادی اختصاصی ضدلیشمانیا از دسته IgG، IgM با روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم مورد آزمایش قرار گرفت (Ranque & quilici - 1970) (۲۱) که به اختصار بشرح زیر است :

پروماستیگوت‌های لیشمانیاماژور که در محیط N-N-N کشت داده شده بود بعنوان آنتی‌ژن استفاده شد. برای این منظور از کشت ۵–۳ روزه (فازلگاریتمی رشد انگل) پاساژ هفتم استفاده گردید. پس از افزودن فرمل سیلین ۱٪و سه بار شستشو با PBS با PH ۷/۲ و شمارش انگل‌ها سوسپانسیونی از آن با تراکم ۳–۲ میلیون انگل در هر سی سی PBS تهیه شد و بمقدار ۱۰ میکرولیتر در وسط حلقه‌های تهیه شده در سطح لام ریخته شد. (Camargo & Rebonato - 1969) [۲۲] و پس از بسته بندی تا زمان استفاده در فریزر ۷۰– درجه سانتی گراد قرار

جدول ۱ : میانگین درصد پروتئین های سرم و فاصله اطمینان ۹۵ درصدی بر حسب حالت بیماری باروش الکتروفورز

نوع آزمایش	آلبومین	آلفایک	آلفادو	بتا	گاما
حالت بیماری	M ± 2 SD	M± 2 SD	M ± 2 SD	M ± 2 SD	M ± 2 SD
خود شفا	۴۳/۲۰±۱۲/۸۸	۲/۹۳±۱/۸۴	۱۳/۸۳±۵/۴۴	۱۵/۴۸±۵/۳	۲۴/۴۸±۹/۵۶
مزمن	۴۳/۶۶±۱۰/۹۲	۳/۶۶±۱/۹۶	۱۳/۳۳±۵/۴۲	۱۶/۹±۷	۲۲/۴۲±۱۰/۴۲
نرمال	۴۴/۸±۷/۵	۲/۷۹±۱/۶	۱۳/۰۱±۳/۸۸	۱۶/۷۳±۵/۵۷	۲۲/۱±۷/۱

جدول شماره ۲ : میانگین عیار آنتی بادی های IgG, IgA, IgM با روش ایمونودیفوزیون رادیال و فاصله اطمینان ۹۵ درصدی در حالات مختلف بیماری (واحد g/L)

نوع آزمایش	IgM	IgG	IgA
حالت بیماری	M ± 2 SD	M ± 2 SD	M ± 2 SD
خودشفا	۲/۳۱ ± ۱/۵۲	۱۵/۹۳ ± ۸/۱۲	۲/۵۴ ± ۲/۰۲
مزمن	۲/۳۸ ± ۱/۶	۱۶/۷۲ ± ۹/۵۸	۲/۳۴ ± ۱/۸۴
نرمال	۲/۳۴ ± ۱/۲۲	۱۵/۰۸ ± ۵/۹۶	۲/۶۱ ± ۲/۶۸

داده شد. کونژوگه های آنتی IgG و آنتی IgM (نشاندار شده با فلورسئین از شرکت بهرینگ خریداری گردید و پس از تعیین تیتر مناسب آن به بخش های کوچک تقسیم و در فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. برای انجام تست ایمونوفلورسانس ابتدا از سرم بیماران با استفاده از PBS با PH ۷/۲ رقت های ۱/۲ ، ۱/۴ ، ۱/۸ ، ۱/۱۶ ... برای سنجش IgM و رقت های ۱/۲۰ ، ۱/۴۰ ، ۱/۸۰ ، ۱/۱۶۰ ، ۱/۳۲۰ ... برای IgG تهیه و به میزان ده میکرولیتر روی خانه های حاوی آنتی ژن قرار داده شد و سپس در اطاقک مرطوب در اتو و ۳۷ درجه به مدت نیم ساعت مجاورت داده شد. لام ها سه بار در PBS شستشو گردید. سپس کونژوگه با تیتراژ شده به مقدار ده میکرولیتر روی سرم های انکوبه شده با آنتی ژن قرار داده شد.

مجدداً لام ها به مدت نیم ساعت در اطاقک مرطوب در ۳۷ درجه انکو به گردید و پس از سه بار شستشو با PBS و گرفتن آب اضافی لام ها، محلول گلسیرین PBS ۱۰ درصد بر روی حلقه ها اضافه گردید و پس از قرار دادن لامل با میکروسکپ فلورسانس مورد بررسی قرار گرفت. در مقایسه با نمونه شاهد آخرین رقتی که انگل ها رنگ سبز درخشان و مداوم داشتند بعنوان عیار آنتی بادی تلقی گردید.

لازم به یادآوری است که از سرم فرد مبتلا به لیشمانیوز جلدی که مدت سه ماه از ابتلاء او گذشته و قبلا تست شده بود بعنوان شاهد مثبت و از سرم فرد نرمال بعنوان شاهد منفی استفاده گردید.

جدول شماره ۳: میانگین عیار آنتی بادی های IgG, IgM و فاصله اطمینان ۹۵ درصدی در حسب روش ایمونوفلورسانس و حالت بیماری

نوع آزمایش	IgM	IgG
حالت بیماری	M ± 2 SD	M ± 2 SD
خود شفا	۶۴ ± ۵/۰۴	۳۲۰ ± ۴/۷
مزمن	۳۲ ± ۴/۷	۴۰ ± ۴/۸
نرمال	۸ ± ۶/۹	۲۰ ± ۶/۶

❐ نتایج :

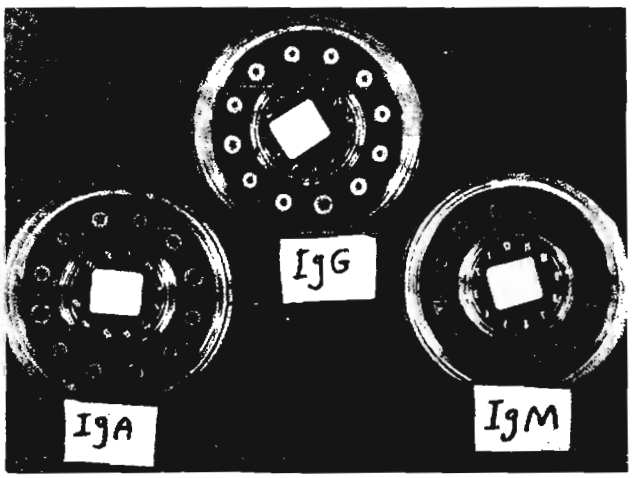
نتایج الکتروفورز پروتئین های سرم در هر سه گروه در جدول شماره ۱ منعکس شده است . همانطوری که ملاحظه میشود از نظر آماری با اطمینان ۹۵٪ میانگین درصد آلبومین ، آلفایک گلبولین ، آلفادوگلبولین، بتاگلبولین، گاماگلبولین ها تفاوت معنی داری در سه گروه نشان نمیدهد .

نتایج ایمونوالکتروفورز :

نتایج حاصل از این بررسی باندهای IgM , IgA , IgG را به خوبی نشان میدهد و هیچگونه باند غیرعادی مشاهده نمیگردد .

اندازه گیری میزان ایمنوگلبولین های تام نتایج بدست آمده از اندازه گیری میزان IgA , IgG , IgMسرم با روش ایمونودیفوزیون رادیال در جدول شماره ۲ نشان داده شده است .

بطوری که در جدول نشان داده شده است بین گروههای مورد مطالعه از لحاظ میانگین این سه نوع ایمونوگلبولین با اطمینان ۹۵٪



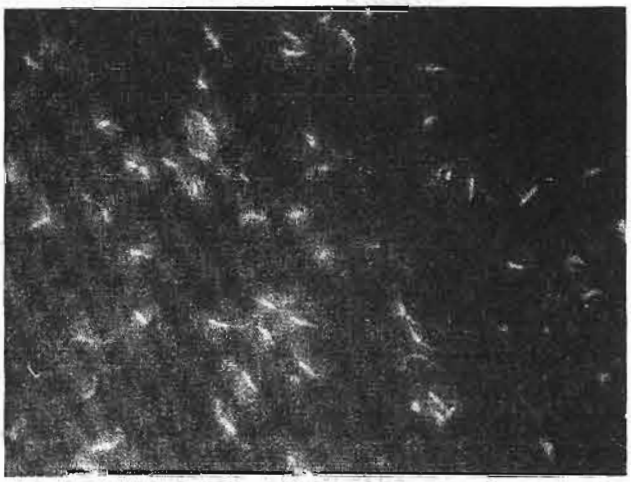
شکل ۴ : دایره های رسوبی تشکیل شده با روش ایمونودیفوزیون رادیال RID

تفاوت چشم گیری مشاهده نمی شود.

اندازه گیری عیار آنتی بادی ضدلیشمانیاماژور با روش ایمونوفلورسانس

نتایج این سنجش در جدول و نمودار شماره ۳ نشان داده شده است.

همانطور که در جدول مشاهده می شود در مقایسه میانگین



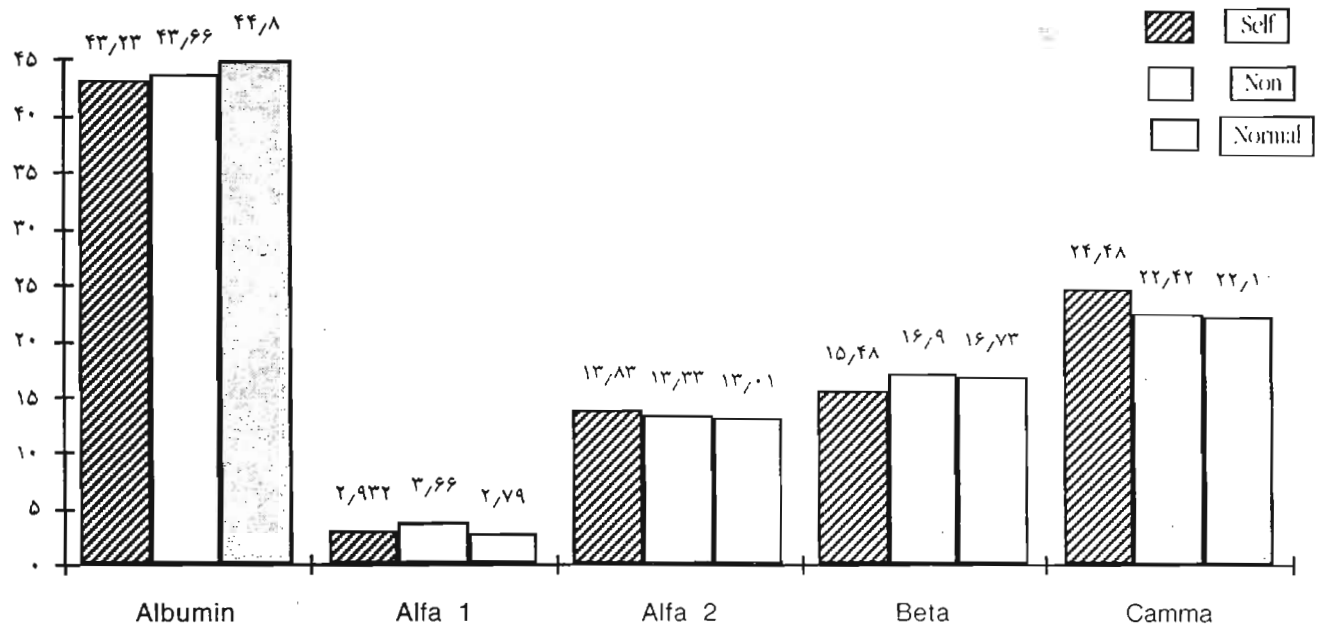
شکل ۵ : انگل لیشمانیوز زیر میکروسکوپ فلورسانس

هندسی ایمونوگلبولین های اختصاصی با یکدیگر در دو گروه Non - healing , Self - healing و همچنین بین دو گروه فوق الذکر و نرمال تفاوت معنی داری وجود دارد ($p<0.05$) . به عبارت دیگر میانگین هندسی عیار آنتی بادی IgM, IgG اختصاصی در بیماران گروه Self - healing بالاتر از Non - healing است .

❐ بحث و نتیجه گیری:

همانطور که نتایج نشان می دهد در میانگین ایمونوگلبولین های توتال (IgA, IgG, IgM) با روش ایمونودیفوزیون رادیال بین گروههای مختلف و نرمال با اطمینان ۹۵٪ تفاوت چشم گیری مشاهده نمی شود. در صورتیکه در همین گروهها از لحاظ میانگین هندسی آنتی بادی های اختصاصی ضدلیشمانیا IgM , IgG بین افراد بهبود یافته و مبتلا به فرم مزمن و گروه نرمال تفاوت قابل ملاحظه ای وجود دارد بدین معنی که بین گروههای خود شفا و نرمال از لحاظ IgM, IgG اختصاصی تفاوت بسیار محسوس است ($P<0.01$ ، اختلاف معنی دار). در حالی که میانگین عیار

نمودار شماره ۱ : میانگین درصد پروتئین های سرم با روش الکتروفورز در گروههای مورد مطالعه



همین آنتی بادی ها در گروه مزمن در مقایسه با گروه نرمال اختلاف بسیار کمتری را نشان می دهد.

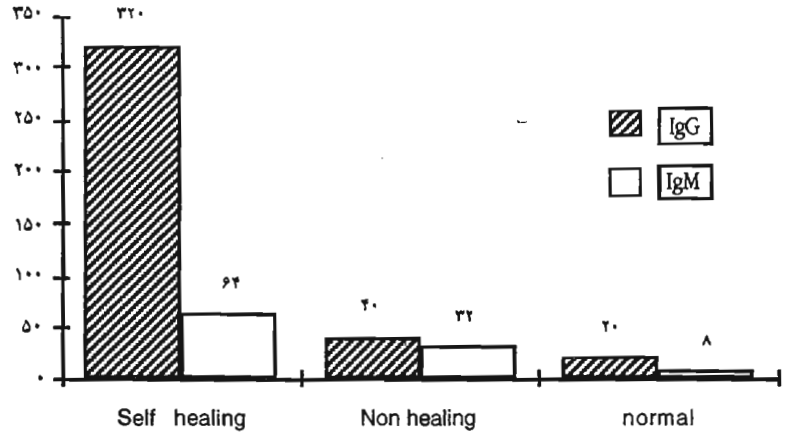
همچنین عیار IgG اختصاصی گروه خود شفا نسبت به مزمن افزایش چشم گیری را نشان می دهد. آنچه از نتایج این بررسی و تحقیق برمی آید بیانگر این است که در اثر ابتلا به لیشمانیوز جلدی میانگین عیار آنتی بادی های اختصاصی افزایش می یابد [۹، ۱۰]. چنانکه در یک مطالعه IgG in - Vitro به مقدار زیاد از ضایعات بافتی بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی سنتز گردیده است (۲۳). از طرفی در مطالعات انجام شده با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال و تکنیک ایمونوپراکسید از غیرمستقیم مشخص شده که انفیلترای جلدی در لیشمانیوز جلدی نه تنها واجد لنفوسیتهای T و ماکروفاژهاست بلکه لنفوسیتهای B و پلاسما سل ها هم که سنتز ایمونوگلبولین ها را به عهده دارند در آن دیده می شود [۸، ۲۳]. در لیشمانیوز احشائی (کالاآزار) مطالعات زیادی در زمینه تغییرات سیستم ایمنی هومورال انجام گرفته [۱۱] ولیکن در لیشمانیوز جلدی این مطالعات به طور وسیع انجام نشده است [۹، ۱۰]. چنانچه در سرم بیماران مبتلا به کالاآزار مقدار IgG سرمی و IgM افزایش نشان می دهد در صورتیکه در میزان IgA تغییری ملاحظه نمی شود [۱۴]. در لیشمانیوز پوستی نیز چند هفته پس از شروع زخم پادتن به میزان کم بوجود می آید.

با استفاده از روش هائی مثل ایمونوفلورسانس غیرمستقیم و الایزامیتوان پادتن های ناشی از بیماری را اندازه گیری کرد و با استفاده از تکنیک رادیو ایمونواسی در ۹۰ درصد از موارد لیشمانیوز پوستی پادتن را نشان داده اند [۱ و ۲۴].

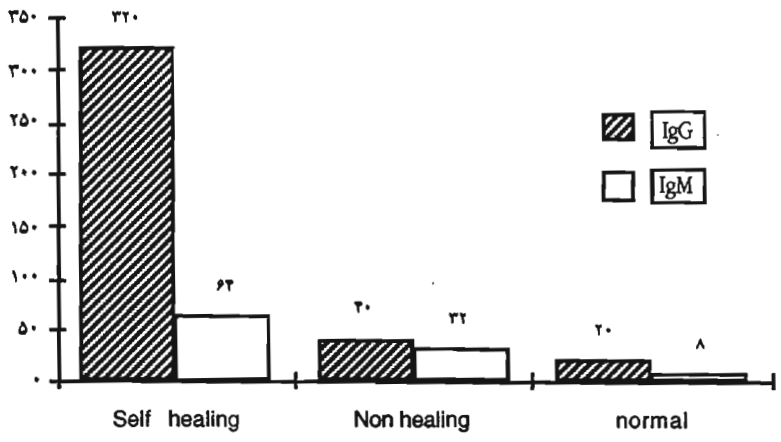
از طرفی با روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم در افراد مبتلابه لیشمانیوز جلدی آمریکائی که ۳ تا ۲۴ ماه از ابتلاءآن گذشته بود تیتر آنتی بادی از ۸ : ۱ تا ۱۲۸ : ۱ متغیر بوده و نوع این آنتی بادی ها, IgM IgA می باشد [۸]. بنابر این از بررسی های بعمل آمده چنین نتیجه می شود که ابتلا به لیشمانیوز جلدی منجر به افزایش ایمنوگلبولین ها می شود.

اگرچه انگل لیشمانیا انگل داخل سلولی است و بیشتر به صورت موضعی در سطح پوست ناحیه آلوده وجود دارد ولی چون پس از تکثیر نیاز به خروج از سلول آلوده و ورود به سلول هدف دیگر دارد آنتی بادی های اختصاصی می توانند در این مرحله وارد عمل شده و انگل را غیرفعال سازند [۲۴].

نمودار شماره ۲: میانگین عیار آنتی بادیهای IgG، IgA، IgM با روش ایمونودیفوزیون رادیال



نمودار شماره ۳: میانگین هندسی عیار آنتی بادیهای اختصاصی (IgM, IgG) با روش ایمونوفلورسانس در گروههای مورد مطالعه



بنابر این ایمنی سلولی و ایمنی هومورال ممکن است هر دو با یکدیگر در جهت پیدایش مصونیت پس از عفونت اولیه نقش داشته باشند. اگر پاسخ ایمنی سلولی به انگل ناقص یا مهار شده باشد، بیماری پوستی منتشر که شانس ناچیزی در بهبودی خودبخود دارد را در پی خواهد داشت.

با وجود اینکه در لیشمانیوز جلدی ایمنی سلولی و لنفوسیتهای T نقش اساسی را بر عهده دارند [۸ و ۹] و ایمنی هومورال یک نقش فرعی دارد ولیکن نمی توان ایمنی سلولی و هومورال را در سیستم های بیولوژیکی بخصوص در حالت Invivo جدا نمود و تأثیر سایتوکین های مترشحه بعد از تمایز سلولهای T را به صورت مجزا مؤثر دانست. زیرا که همکاری و اثرات متقابل آنها نتیجه نهایی را حاصل می کند. همچنین باید خاطر نشان کرد که:

۱- مطالعه انسانی چه در سطح آنتی بادی چه در سطح سایتوکاین های سلول T خیلی محدود است.

۲- نتایجی که در موش بدست آمده است نمی تواند معیاری برای پاسخهای موارد انسانی باشد. از آنچه گفته شد چنین نتیجه می شود که بهبودی از بیماری حاصل همکاری ایمنی سلولی و هومورال است و بنابر این نقش آنتی بادی ها را در ایمنی در برابر لیشمانیوز نباید از نظر دور داشت زیرا پادتن ممکن است از تماس انگل با ماکروفاژ جلوگیری کند و مانع از عفونت مجدد شود، البته در این مورد مطالعات به طور کامل صورت نگرفته است.

گروهی از محققین معتقدند که چون لیشمانیا یک انگل داخل سلولی است و برای ازدیاد و تولیدمثل به درشتخواران نیاز دارد، پادتن ضدلیشمانیا قادر است به سطح درشتخوار (ماکروفاژها) بچسبد و مانع از ورود انگل به داخل آن شود. شاید پادتن از این راه مانع از رشد و ازدیاد انگل شود و بدین ترتیب در مکانیسم ایمنی بر ضدبیماری شرکت کند. بدیهی است اگر چنین وضعی پیش آید یعنی به عللی انگل نتواند به داخل سلولهای بیگانه خوار وارد شود عوامل مقاومت طبیعی و یا پادتن ایجاد شده در اثر ایمنی قادر است انگل لیشمانیا را بی حرکت کرده و از بین ببرد.

گرچه در مورد نقش پادتن در ایجاد ایمنی در برابر لیشمانیا گزارشات چندانی منتشر نشده است ولیکن آنچه مسلم است این است که لنفوسیتهای T نوع Helper کمک می کنند که لنفوسیتهای B پلاسما سل ها را تولید کنند که بصورت فعال ایمونوگلبولین ها و در نتیجه آنتی بادی را بسازند.

در هر حال در مورد نقش ایمنوگلبولین ها در بیماری لیشمانیوز جلدی بررسی و تحقیقات بیشتری لازم است و شاید این تحقیقات راهگشای درمان های سریع تر و مؤثرتری برای افرادی باشد که از بیماری رنج می برند و به درمان پاسخ نمی دهند.

در خاتمه از همکاری صمیمانه سرکار خانم مریم ابوالقاسمیان و همچنین جناب آقای دکتر میرشمس و پزشکان متخصص پوست درمانگاه پوست بیمارستان رازی، بخش پوست بیمارستان لقمان، سرکار خانم دکتر نبئی، دپارتمان لیشمانیوز دانشکده بهداشت دانشگاه تهران که در معرفی بیمار همکاری صمیمانه داشته اند قدردانی و تشکر می شود.

References

انتشار جغرافیائی آن در ایران، ۱۹۰۷، تهران: دانشکده پزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۵۸.

1- Graciela Rosen, Mauricio V.Londner and Charles L. Greenblatt Leishmania major: Solidphase Radioimmunoassay for Antibody Detection in Human Cutaneous Leishmaniasis. Experimental parasitology, (1986) 62, 79-84.

۲- میرسپاسی – حسن، استاد راهنما: دکتر محقق – امیرپاشا، سالک و

3- Farah, FS &J.A. Malek. Cutaneous Leishmaniasis. Archives of Dermatology & syphilology, (1971) 103: p 467-474.

4- Bryceson, A.D.M. Cutaneous Leishmaniasis. British Journal of

Dermatology, (1976) 29: p 223-226.

۵- اصیلیان، علی، لیشمانیوز جلدی (سالک) و روشهای درمانی و پیش گیری آن، ۱۵۹ : اصفهان دانشگاه علوم پزشکی اصفهان ، معاونت پژوهشی، ۱۳۷۱ .

6- Kurban, A.K, J.A.Malek, F.farah, &II. Chaglassian . Histopathology of Cutaneous Leishmaniasis. Archieves of Dermatology, (1966); 93: p,369-401.

۷- دهقانی احمدآبادی، محمد، استاد راهنما: دکتر ناصر صادقی، سالک از دیدگاه اپیدمیولوژی تخصصی، ۱۰۱۱۹ : تهران: دانشکده پزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۵۷ .

8- G. Harms, K. Zwingenberger, A.K. chehade, S. Talhari, p. pacz, A Mouakeh, el, al. Effects of Intradermal Gamma - Interferon in Cutaneous Leishmaniasis. The Lancet, June 10, 1989: 1287-1292.

9-Robert M. Matossian, M.D, Amal K, Kurban, M.D and John A. Malak, M.D. Circulating Antibodies in Cutaneous Leishmaniasis Their Detection by Immunofluorescence. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicin & Hygiene, 1973; 69 (586): 450-453.

10- N. Behforouz, H.R. Rezai and S. Gettner. Application of Immunofluorescence to Detection of Antibody in Leishmanial Infections. Annals of Tropical Medicin & Parasitology. 1976, 70: 293-301.

11- Gh. Edrissian, P.Darabian, Z.Zovein, M.A. Seyedi - Rashti and A. Nadim Application of the Indirect Fluorescnt Antibody Test in The serodiagnosis of Cutaneous & Visceral Leishmaniasis in Iran. Annalsof Tropical Medicin and Parasitology, 1981, Feb; 75(1): 19-24.

12- M.C.S. Guimaraes, B.J. Celeste, E.L. Franco, L.C. Cuce and W. Beldjr Evaluation of Serological Diagnostic Indices for Mucocutaneous Leishmaniasis. Immunofluorescnce tests & Elisa for IgA, IgG, IgM Antibodies. Bulletin of the world Health organisation 1989; 67 (6): 643-648 1989.

13- Jyh. Wei shin, David chao. Use of the Enzyme - Linked Immunosorbent Assay (Elisa) for Detection of Circulating Antibodies to Human Leishmaniasis. International Journal of Zoonoses, 1986; 13(2): 131-137.

14- Jean Irunberry, Aldjia Benallegue, Jean - Paul Grangaud, Mustapha Mazouni, Boussaad khati , mostefa khedri Etude der Immunoglobulins plasmatiques dans le kala - Azar. Archives de 1, Institut pasteur d, Algerie.(1967); 68-89: 45-47.

15- Grabar P, willians C.A. Biochem, Biophys. Acta, 1955; 17: 67

16- Fahey -J.F- , Mckelvey E.M. J Immunol. 1969; 94: 84

17- S.S. Kelkar, P.M. Khare Gel Immunodiffusion techipues in Research and Laboratory Medicine, 1984, 108 - 142.

18- Mancini G. , Carbonara A.O. and Heremans J.F. Immunochemical Quantitation of antigen by single imunodiffusion, Imunochem, 1965; 2:235.

19- Mancini, G, Nash, D.R , Heremans, J.F. further studies on single radial Immunodiffusion III. Quantitative analysis of related and unrelated antigens. Immunochem, 1976; 7: 261

20- Fahey, J.L. and M.C kelvey, E.M. Quantitative determination of serum Immunoglobulin in antibody agar plates, J. Immunol 1965; 94:84

21- Ranque J. and Quilici M. Recent advances in immunodiagnosis of Leishmaniasis. Journal of parasitology 1970; 56: 277-278

22- Camargo, M.E. and Rebonato, C. Cross reactivity in Fluorescet test for trypanosoma and leishmania antibodies, a simple inhibition procedure to ensure specific results. Am. J. Trop. Med Hyp 1969; 18: 500-505.

23- Rudy F.M. Lai A fat, Jimmy C. chan pin Jin, Robby G.H.M. Lieuw A Joe, Martina M.C. Diesselhoff - Dendulk and Ralph van Furth In Vitro Synthesis of Immunoglobulins in Cutaneous Leishmaniasis. American Journal of tropical Medicin & Hygiene 1988; 38(3): p 474-476 (86-180).

۲۴- اردهالی، صدرالدین، رضایی، حمیدرضا، ندیم، ابوالحسن، انگل لیشمانیا و لیشمانیوزها چاپ دوم: تهران: مرکز نشر دانشگاهی تهران، ۱۳۷۳، ۱۲۹-۱۳۷