تهیه واکسن کشته لیشمانیا و ارزشیابی تجربی آن به منظور کنترل لیشمانیوز احشایی در سگ ها

دکترمهدی محبعلی [1]، دکتراسماعیل فلاح [1] ، دکترشهرام جمشیدی [2] ، هماحجاران[1]

واژه های کلیدی : *واکسن لیشمانیا ، سگ ، لیشمانیوز احشایی*

چکیده

دراین مطالعه ، ۱۶ قلاده سگ که از نظر تست لیشمانین منفی بوده و هیچ گونه آنتی بادی برعلیه *لیشمانیا* نداشتند به شکل تصادفی به چهار گروه چهار تایی تقسیم شدند. به گروه اول واکسن کشته لیشمانیا اینفانتوم همراه با ب.ث.ژ، به گروه دوم واکسن کشته *لیشمانیاماژور* همراه با ب.ث.ژ، به گروه سوم ب.ث.ژ، تنها و به گروه چهارم سرم فیزیولوژی تزریق گردید. تزریقات بـــه شکل داخل جلدی و سه نوبت به فواصل ۳۰ روز انجام شدند. تمامی سگ ها هر دو ماه یک بار به وسیله تست پوستی لیشمانین و روش های سرولوژی الیزا و آگلوتیناسیون مستقیم مورد آزمایش قرار گرفتند. نود روز پس از تزریق نوبت سوم واکسن، همه سگ های تحت بررسی به وسیله ۲/۵ میلیون پرومامستیگوت زنده و فعال *لیشمانیاایفـانتـــوم* به روش داخل صفاقی تلقیح شدند. پس از گذشت هفت ماه تمامی سگ ها کالبدگشایی شدند و با استفاده از روش های پارازیتولوژی و سرولوژی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصله از این بررسی نشان می داد تمامی سگ های گروه کنـــترل (غیرواکسینه ها) به لیشـــمانیوز احشایی مبتلا شدند در حالی که فقط یکی از سگ های گروه واکسینه عفونت با *لیشمانیا اینفانتوم* را نشان دادند.

سرآغاز

لیشمانیوز احشایی (کالاآزار) بیماری عفونی - انگلی است که اگر به موقع تشخیص و درمان نشود در اکثر موارد سبب مرگ بیمار می گردد. این عفونت به نسبت قابل ملاحظه ای بدون علایم بالینی است، و انگل در بدن باقی می ماند و تحت شرایطی از جمله کاهش مصونیت نسبی و سوءتغذیه مجدداً فعال شده و ظاهر می شود. کالاآزار در ایران از تیپ مدیترانه ای است که عامل آن *لیشمانیاایفانتوم*، ناقل آن گونه هایی از پشه خاکی ها و مخزن انگل ، سگ و سگ سانان وحشی (شغال و روباه) می باشد (۲).

۱- گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی ، دانشگاه علوم پزشکی وخدمات بهداشتی درمانی تهران، صندوق پستی ۱۴۱۵۵-۶۴۲۶ ، تهران .

۲- گروه بیماری های داخلی دام های کوچک ، دانشکده دامپزشکی ، دانشگاه تهران، تهران، ایران

سگ یکی از منابع آلودگی انسان در مناطق اندمیک این بیماری در ایران محسوب می گردد. کالاآزار اکثراً در بچه های زیر ۹ سال مشاهده می شود. این بیماری از تمامی استان های کشور کم و بیش گزارش شده است که در بعضی از مناطق استان اردبیل (شهرستان های مشکین شهر و دشت مغان) و استان فارس (جهرم ، قیر و کارزین)) به شکل اندمیک با [illegible] بالا شیوع دارد. در سایر استان های کشور موارد کالاآزار اغلب به شکل اسپورادیک [illegible] شده اند (۳).

مطالعات مختلف نشان می دهند جهت کنترل لیشمانیوز احشایی نوع مدیترانه ای مبارزه با ناقلین چندان مفید به نظر نمی رسد و درمان سگ های مبتلا به هیچ وجه توصیه نمی گردد زیرا احتمال ایجاد سوش های مقاوم نسبت به ترکیبات آنتی موآن در انسان وجود دارد. به علاوه استفاده از کلوکانتیم جهت درمان سگ ها چندان موثر نمی باشد (۷). لذا ایمن سازی سگ های چندماهه یکی از مفیدترین و عملی ترین روش های کنترل لیشمانیوز احشایی در سگ ها و نتیجتاً کاهش موارد آلودگی انسان به شمار می رود.

نمونه گیری و روش بررسی

نوع مطالعه در این بررسی تجربی بوده است. جهت این بررسی ۱۶ قلاده سگ از جنس، سن و نژادهای مختلف انتخاب شده و به طور تصادفی به چهار گروه ۴ قلاده ای تقسیم شدند و در قفس های جداگانه در دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران نگهداری گردیدند. قبل از تزریق واکسن ، تمامی سگ ها با استفاده از تست جلدی مونته نگرو (لیشمانین) و آزمایش های سرولوژی الیزا (ELISA) و آگلوتیناسیون مستقیم (DA) از نظر ابتلا به لیشمانیوز احشایی مورد بررسی قرار گرفتند. سگ هایی جهت این بررسی انتخاب می شدند که از نظر تمامی آزمایش های مذکور منفی بوده و به عبارت بهتر با انگل های لیشمانیا تماس نداشتند.

الف : مراحل تهیه واکسن کشته *لیشمانیاایتانتوم* در واحد تک یاخته شناسی دانشکده بهداشت :

۱- جداسازی انگل *لیشمانیاایتانتوم* از یک قلاده سگ مبتلا به لیشمانیوز احشایی در روستای قورت [illegible] استان مشکین شهر.

۲- تکثیر انگل بدست آمده در محیط های اختصاصی و تکثیر انبوه آن

۳- تعیین مشخصات انگل جدا شده با استفاده از روش استاندارد ایزوآنزیم. سوش مذکور *لیشمانیاایتانتوم* [1] تعیین گردید. قبلاً نیز این سویه از انسان دراین منطقه جدا گردیده بود.

۴- تکثیر انگل ها در محیط NNN+LIT [2] و دو تا سه مرتبه پاساژ در این محیط و سپس انتقال تمامی فاز مایع این محیط به محیط کشت PRMI + FCS (20%) و چهار تا پنج پاساژ در محیط مذکور.

1- L..infantum LON49

2- Liver Infusion Broth - Tryptose

۵- برداشت تمامی پروماستیگوت ها در مرحله فاز ثابت رشد و چهار مرتبه شستشو با استفاده از سانتریفوژ یخچال دار و PBS با PH =۷/۲ و شمارش انگل ها با استفاده از لام توما.

۶- تقسیم یک میلی لیتر واکسن تهیه شده در ویال های ۲ میلی لیتری و تعیین پروتئین تام آن به روش لوری [1] که به میزان ۵/۴ mg/ml تعیین گردید.

۷- اتوکلاو واکسن در حرارت 121^0C و فشار ۱۵ پوند به مدت ۱۵ دقیقه.

۸- کنترل نمونه ها در زمان تهیه و همچنین قبل و پس از تقسیم آنها از نظرا سترلیتی و اندازه گیری اندوتوکسین.

واکسن کشته *لیشمانیاماژور* براساس دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی توسط، آقای دکتر فشارکی و همکاران در انستیتو رازی حصارک تهیه شده و توسط مرکز پژوهش های بیماری های پوست و جذام دراختیار این بررسی قرار می گرفت (۱).

ب : گروه بندی سگ های مورد بررسی :

سگ های انتخاب شده به ۴ گروه چهارتایی تقسیم شده و به روش زیر مورد آزمایش قرار گرفتند :

گروه ۱) تزریق واکسن کشته *لیشمانیاایتانتوم* +ب.ث.ژ تهیه شده در واحد تک یاخته شناسی دانشکده بهداشت ، دانشگاه علوم پزشکی تهران با غلظت ۱۰ mg/ml پروتئین تام.

گروه ۲) تزریق واکسن کشته *لیشمانیاماژور*+ ب.ث.ژ تهیه شده در انستیتو رازی حصارک با غلظت ۱۰ mg/ml پروتئین تام.

گروه ۳) تزریق ب.ث.ژ به میزان ۶۵۰ mg/ml

گروه ۴) تزریق سرم فیزیولوژی .

تزریقات به حجم ۰/۱ میلی لیتر سه نوبت و به فاصله حدود یک ماه انجام گرفته است. میزان غلظت ب.ث.ژ که به عنوان ادجووانت در این بررسی به کار رفته است باتوجه به منابع موجود به مقدار ۶۵۰ mg/ml در هر دوز تزریقی واکسن تعیین گردید.

ج : نحوه بررسی بی خطری واکسن های تهیه شده در سگ ها :

۱- انجام آزمایش های کلینیکی قبل از تزریق واکسن و تا دو ماه پس از تزریق واکسن در فواصل زمانی معین.

۲- انجام آزمایش های هماتولوژی (CBC ، هماتوکریت و بیوشیمیایی از قبیل SGPT و SGOT) در سگ ها قبل از تزریق واکسن.

۳- تکرار آزمایش های فوق دو هفته پس از تزریق واکسن ها به منظور بررسی تغییرات غیر طبیعی در بدن .

د : نحوه ارزشیابی ایمنی زایی [2] واکسن های تهیه شده در سگ ها:

1- Lowry

2- Immunogenicity

انجام تست پوستی مرتنه نگرو با استفاده از لیشمانین ساخت انستیتو پاستور ایران و انجام آزمایش های سرولوژی DA و ELISA قبل از تزریق و ۲ ، ۶ و ۱۲ ماه پس از تزریق واکسن ها.

نحوه ارزشیابی تاثیر[1] واکسن های تهیه شده در سگ ها :

تمامی سگ های واکسینه و کنترل دو ماه پس از تزریق آخرین نوبت واکسن با حدود دو و نیم میلیون پروماستیگوت زنده و فعال *لیشمانیاانفانتوم* که قبلاً از سگ مبتلا به لیشمانیوز احشایی جدا شده بود به شکل داخل صفاقی (IP) ، تلقیح شدند. نتایج حاصله تا ۷/۵ ماه پس از آلوده کردن سگ ها با انگل های زنده پاتوژن ، مورد بررسی قرار گرفتند. درضمن جهت بررسی قدرت آلوده کنندگی[2] سوش *لیشمانیاانفانتوم* قبل از تلقیح به سگ ها بر روی دو قلاده سگ دیگر (غیر از شانزده قلاده سگ های قبلی) مورد بررسی قرار گرفت.

جهت نتیجه گیری نهایی معاینات بالینی ، آزمایش های سرولوژی (DA , ELISA) و پاتولوژی (آزمایش مستقیم ، کشت ، تلقیح به حیوانات حساس آزمایشگاهی) در گروه های تحت بررسی و کنترل به عمل آمد.

یافته ها و گفتگو و بهره گیری پایانی

اصولاً لیشمانیوز احشایی از نظر اپیدمیولوژی دارای سه تیپ هندی ، افریقایی و مدیترانه ای است. فرم مدیترنه ای بیماری دارای انتشار جغرافیایی وسیعی است و سگ ها مهم ترین منابع آلودگی برای انسان در مناطق اندمیک این بیماری به شمار می روند(۸). شغل اصلی اکثر مردم در مناطق اندمیک این بیماری ، گله داری و دامداری است و لذا با سگ های گله تماس نزدیکی دارند که این مسئله برقراری سیکل انتقال را بیشتر می سازد. مطالعات مختلف نشان می دهند ترکیبات آنتی موآن که جزء داروهای رده اول درمانی لیشمانیوز به شمار می روند جهت درمان سگ ها به خوبی اثر ندارند (۷). علاوه برآن درمان سگ های مبتلا ، امکان پیدایش سوش های مقاوم نسبت به داروهای شیمیایی در انسان را افزایش می دهد. لذا بنا به دلایل فوق درمان لیشمانیوز احشایی سگ ها توصیه نمی شود. شاید یکی از بهترین و موثرترین روش های کنترل این بیماری در سگ ها و درنهایت در انسان ، ایمن سازی تمامی سگ های صاحب دار مناطق اندمیک و ازبین بردن سگ های ولگرد باشد. تعداد مطالعات انجام شده در مورد ایمن سازی سگ ها بر علیه لیشمانیوز احشایی بسیار اندک بوده و با نتایج ضد و نقیضی نیز همراه بوده اند.

واکسن تهیه شده در سال ۱۹۸۸ نشان داد که نه تنها واکسن سنتتیک تهیه شده از بعضی از اجزاء پروتئینی لیشمانیا در ایجاد محافظت سگ ها در برابر سوش احشایی لیشمانیا موثر نبوده است بلکه در مدل موشی حیوان را نسبت به ابتلاء مجدد حساس تر نموده است (۵). البته در این بررسی از واکسن

1- Efficacy
2- Infectivity

سنتتیک لیشمانیا استفاده شده و نوع ادجوانت استفاده شده مورامیل دی پپتید (MDP) بود که امروزه مشخص شده است این ماده به عنوان ادجوانت برای واکسن لیشمانیا مناسب نمی باشد. دراین تحقیق از واکسن نیمه سنتتیک مشابه جهت ایمن سازی موش های آزمایشگاهی استفاده شده که با نتایج مطلوبی همراه بوده است(۶).

تحقیقات مشابه ای (۷) در سال ۱۹۹۶ در کشور برزیل به عمل آمد که با نتایج مطلوب و رضایتبخشی همراه بوده است. این بررسی بر روی ۱۹ قلاده سگ انجام گردید. از *L.braziliensis* جهت واکسیناسیون سگ ها و از *L.chagasi* جهت درگیری[1] استفاده شد. در این بررسی از ۱۰ قلاده سگ گروه واکسینه فقط یک قلاده به لیشمانیوز احشایی مبتلا شدند در حالی که هر ۹ قلاده سگ های گروه کنترل به این بیماری مبتلا گردیدند (۴).

نتایج حاصله از این بررسی ما را به تهیه و ارزشیابی واکسن های کشته لیشمانیا و استفاده از آنها جهت ایمن سازی سگ ها ترغیب نمود.

جهت ارزشیابی هر نوع واکسنی لازم است ابتدا بی خطر بودن[2] و سپس ایمن زایی و آنگاه تاثیر آن مورد بررسی دقیق قرار گیرد.

در رابطه با بی ضرری واکسن های کشته لیشمانیا در سگ ها نتایج این بررسی که جداول شماره های ۱ و ۲ خلاصه شده است نشان می دهد که بااستفاده از روش آنالیزواریانس یک طرفه و با سطح اعتماد ۹۵٪ (P< ۰/۰۵)هیچگونه اختلاف معنی داری در میزان هماتوکریت ، SGPT ، SGOT ، ائوزینوفیل ، نوتروفیل ، بازوفیل ، لنفوسیت و مونوسیت سگ های واکسینه و غیرواکسینه در مقایسه با زمان قبل از تزریق واکسن وجود ندارد. به عبارت ساده تر غلظت های مختلف واکسن کشته *لیشمانیاانفانتوم* و *لیشمانیاماژور* هیچگونه تغییر معنی داری در میزان ترکیبات خونی را باعث نمی گردند ، در ضمن معاینات بالینی انجام شده پس از واکسیناسیون هیچگونه اختلالی را در سگ ها نشان نداده است بنابراین می توان چنین نتیجه گیری نمود که واکسن های به کار رفته در سگ ها کاملاً بی خطر بوده اند.

جهت بررسی ایمنی زایی واکسن های مورد استفاده ، اقدام به تست جلدی لیشمانین گردید. لازم به ذکر است که تست جلدی در تمامی سگ ها قبل از تزریق واکسن منفی بوده است (<5mm). جدول شماره ۳ نتایج تست جلدی را ۶۰ روز پس از واکسیناسیون نوبت اول نشان می دهد. تست جلدی تمامی سگ هایی که به وسیله *لیشمانیاانفانتوم* به همراه BCG واکسینه شده بودند با میانگین ۶/۳ میلی متر مثبت شدند. در حالی که تست جلدی فقط در یکی از سگ های واکسینه با *لیشمانیاماژور* + BCG مثبت شده بود و در تمامی سگ های گروه کنترل منفی باقی مانده بودند. این موضوع نشان می دهد واکسن کشته *لیشمانیاانفانتوم* + BCG از قدرت بیشتری جهت تحریک سیستم ایمنی سلولی برخوردار است و سگ ها نیز نسبت به این نوع آنتی ژن حساسیت بیشتری

1- Chalenge
2- Safety

نشان می دهند.

جدول شماره ۴ نشان دهنده آن است که احتمالاً مثبت شدن تست جلدی پس از استفاده از *لیشمانیاماژور* + BCG به زمان بیشتری نیاز دارد زیرا پس از گذشت ۵ ماه از نوبت اول واکسیناسیون اولاً آزمایش پوستی تعداد بیشتری از سگ ها مثبت شدند و ثانیاً قطر ایندوراسیون ایجاد شده (8mm) به طور قابل ملاحظه ای از ایندوراسیون قبلی (6mm) بیشتر بوده است. تست جلدی در سگ های گروه BCG و سرم فیزیولوژی همچنان منفی باقی مانده بودند. بنابراین می توان چنین نتیجه گرفت که اصولاً واکسنهای کشته لیشمانیا قادر به تحریک سیستم ایمنی سلولی هستند که این موضوع می تواند نتیجه ای امیدبخش دراین مورد به حساب آید.

نتایج آزمایشات سرولوژی نشان می دهند هیچ یک از سگ ها پس از تزریق واکسن کشته لیشمانیا آنتی بادی اختصاصی بر علیه لیشمانیا را نشان نمی دادند و به عبارت ساده تزریق واکسن های کشته لیشمانیا قادر به تحریک ایمنی هومورال و ایجاد آنتی بادی در سگ ها نمی باشد. این نتایج با نتایج مطالعات انجام شده کاملاً همخوانی دارد (۷). البته بایستی خاطرنشان ساخت که اصولاً آنتی بادی ها نقش قابل توجهی در ایجاد ایمنی و محافظت بدن در برابر عفونت لیشمانیایی ندارند.

جهت نتیجه گیری نهایی و تعیین قدرت محافظت واکسن های کشته لیشمانیا در سگ ها، تمامی سگ های مورد بررسی سه ماه پس از تزریق نوبت سوم واکسن ، با حدود ۲/۵ میلیون پروماستیگوت زنده و فعال *L.infantum Lon49* که برای اولین مرتبه از سگی در شهرستان لنکران شهر جدا شده بود درگیر شدند.

جدول شماره ۵ نشان می دهد که پس از گذشت ۷ ماه از لیشمانیزاسیون تمامی سگ های مورد بررسی کالبدگشایی شده و از نظر پارازیتولوژی و سرولوژی مورد مطالعه دقیق قرار گرفتند. هر ۸ قلاده سگ گروه کنترل (شاهد BCG و شاهد سرم فیزیولوژی) از نظر پارازیتولوژی مثبت شده و در گسترش های تماسی تهیه شده از کبد و طحال و غدد لنفاوی این حیوانات جسم لیشمن مشاهده گردید و انگل های جدا شده از تمامی این سگ ها در محیط های کشت اختصاصی رشد نمودند که پس از بررسی بیوشیمیایی به روش های *ایزوآنزیم* و PCR نوع انگل *لیشمانیاینفانتوم* تعیین گردید که با نوع انگل استفاده شده در واکسن و درگیری کاملاً یکی بوده اند. نکته جالب توجه آن که فقط یک قلاده از سگ های گروه واکسینه (مربوط به واکسن *لیشمانیاماژور* + BCG) پس از تلقیح انگل های زنده مثبت گردید و بقیه سگ های گروه واکسینه با *لیشمانیاینفانتوم* و *لیشمانیاماژور* به لیشمانیوز احشایی مبتلا نشدند در حالی که کلیه سگ های گروه شاهد پس از Challenge به این بیماری مبتلا شدند. نتایج تست پوستی و تست سرولوژی الیزا با نتایج پارازیتولوژی همخوانی داشته و این موضوع نشان می دهد که می توان از تست سرولوژی و تست جلدی جهت تعیین سگ های آلوده به طور مطلوب استفاده نمود.

در پـــایان بایستی به این نکته اشاره شود که این بررسی نشان می دهد واکسن های کشته *لیشمانیاماژور* و *لیشمانیاینفانتوم* قادر به محافظت سگ ها در برابر *لیشمانیاینفانتوم* در شرایط آزمایشی هستند. از آنجایی که در این بررسی از لیشمانیاینفانتوم پرورش یافته در شرایط آزمایشگاهی جهت درگیری استفاده شده است و ممکن است انگل های کشت شده با انگل هایی که به طور طبیعی توسط پشه خاکی ها منتقل می شوند از نظر آنتی ژنیسیتی و پاتوژنیسیتی متفاوت باشند ، لذا این مطالعه در شرایط طبیعی و در مناطق اندمیک مشکین شهر بر روی تعداد بیشتری از سگ ها شروع شده است که پس از این بررسی می توان به ارزشیابی نهایی این واکسن پرداخت.

سپاسگزاری

با تشکر و سپاس فراوان از آقایان دکتر غلامحسین ادریسیان ، دکتر ابوالحسن ندیم و دکتر محمدعلی راد ، دکتربحیی دولتی و دکترعلی خامنی پور و دکتررضاهاشمی فشارکی که با پشتیبانی خود امکان پیشرفت هرچه بهتر این مطالعه را فراهم ساختند و با تشکر از مسئولین محترم دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران که با قرار دادن مکان مناسب جهت نگهداری حیوانات مورد مطالعه ما را در اجرای این بررسی یاری نمودند و با تشکر فراوان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران که پشتیبانی مالی این طرح را بعهده داشتند و با تشکر فراوان از معاونت محترم پژوهشی علوم پزشکی تهران که پشتیبانی مالی این طرح را بعهده داشتند.

شترنگ ۱ - بررسی فاکتورهای خونی و ترانس آمینازهای سرم قبل از واکسیناسیون نوبت اول در سگ های مورد مطالعه

ردیف	قبل از واکسیناسیون							
	(همئوکریت) HCT	WBC (%)						
		N	E	B	L	M	جمع	SGOT	SGPT
۱	۴۲	۴۹	۱۴	۰	۳۳	۴	۹۱۰۰	۴۷	۴۵
۲	۴۳	۳۰	۶	۰	۳۰	۰	۸۰۰۰	۴۲	۴۳
۳	۵۶	۶۰	۴	۰	۳۰	۲	۷۰۰۰	۴۷	۴۷
۴	۴۶	۷۸	۸	۰	۱۲	۲	۱۱۰۰	۴۰	۷۳
۵	۳۵	۶۴	۰	۰	۳۰	۶	۷۲۰۰	۴۵	۴۵
۶	۵۰	۶۶	۲۰	۰	۱۲	۲	۳۰۵۰	۴۷	۵۰
۷	۴۵	۶۴	۴	۰	۲۸	۴	۴۰۵۰	۳۵	۳۷
۸	۴۲	۹۰	۰	۰	۸	۲	۷۰۰۰	۲۵	۳۷
۹	۴۸	۳۰	۲۶	۰	۴۲	۴	۸۶۶۰	۴۵	۴۲
۱۰	۴۰	۵۰	۶	۰	۳۶	۶	۴۲۰۰	۵۰	۵۱
۱۱	۳۹	۷۰	۴	۰	۲۲	۲	۶۷۰۰	۳۳	۴۱
۱۲	۴۶	۸۴	۴	۰	۲۲	۰	۴۷۰۰	۳۳	۴۵
۱۳	۴۸	۷۴	۰	۰	[illegible]	۰	۶۰۰۰	۴۸	۴۵
۱۴	۴۱	۵۸	۲	۰	۳۲	۴	۹۲۵۰	۴۵	۴۳
۱۵	۵۴	۶۴	۱۳	۰	۳۱	۲	۹۶۰۰	۴۵	۴۷
۱۶	۴۶	۶۲	۶	۰	۲۶	۳	۱۲۶۶۰	۳۳	۳۲

شترنگ ۲ - بررسی فاکتورهای خونی و ترانس آمینازهای سرم ۲۰ روز بعد از واکسیناسیون نوبت اول در سگ های مورد مطالعه

ردیف	قبل از واکسیناسیون							
	(همئوکریت) HCT	WBC (%)						
		N	E	B	L	M	جمع	SGOT	SGPT
۱	۴۱	۵۶	۶	۰	۳۵	۳	۶۲۵۰	۴۹	۴۸/۵
۲	۴۳	۶۹	۴	۰	۲۵	۲	۱۱۳۰۰	۴۶	۴۷/۵
۳	۴۹	۶۳	۳	۰	۳۳	۱	۶۶۰۰	۵۳	۴۷
۴	۴۹	۵۶	۲۲	۰	۱۹	۲	۱۰۵۰۰	۴۷	۷۷
۵	۴۰	۶۲	۶	۰	۳۱	۴	۹۷۰۰	۵۲	۵۰
۶	۴۹	۷۴	۱۴	۰	۱۱	۱	۷۰۰۰	۵۱	۵۴
۷	۴۴	۶۸	۷	۰	۲۵	۲	۶۵۵۰	۳۷	۳۸
۸	۴۶	۷۳	۶	۰	۱۸	۲	۲۱۰۰۰	۳۹	۴۳
۹	۴۶	۴۵	۱۳	۰	۳۳	۲	۱۳۸۰۰	۴۹	۴۲/۵
۱۰	۴۲	۶۹	۹	۰	۲۰	۵	۱۳۱۵۰	۵۲	۵۸
۱۱	۴۴	۵۲	۲۲	۰	۲۶	۱	۱۰۰۰۰	۳۴	۴۲
۱۲	۵۴	۵۱	۲۲	۰	۲۵	۱	۷۵۵۰	۴۳	۴۷/۵
۱۳	۵۴	۵۸	۶	۰	۳۵	۱	۹۲۰۰	۵۷	۴۹
۱۴	۴۵	۴۷	۱۵	۰	۳۵	۲	۵۹۰۰	۴۹	۴۹
۱۵	۴۸	۶۱	۵	۰	۳۳	۱	۱۱۷۵۰	۴۹	۵۲/۵
۱۶	۵۰	۵۷	۲	۰	۴۰	۱	۱۴۳۰۰	۳۹	۴۴/۵

شترنگه ۳ - نتایج تست مونته نگرو (لیشمانین) ۶۰ روز پس از واکسیناسیون نوبت اول

شماره گروه	نوع تزریق	تعداد	نتیجه تست جلدی			میانگین تست پوستی پس از تزریق برحسب میلی لیتر
			قبل از تزریق	پس از تزریق		
				منفی	مثبت	
۱	ALi+BCG*	۴	Negative	۰	۴	۶/۳
۲	ALm+BCG**	۴	»	۳	۱	۶
۳	BCG	۴	»	۴	۰	۰
۴	Normal Saline	۴	»	۴	۰	۰
	جمع	۴	۱۶	۱۱	۵	۶/۱۵

* ALi = Autoclaved leishmania infantum

** ALm = Autoclaved leishmania major

شترنگه ۴ - نتایج تست مونته نگرو (لیشمانین) ۵ ماه پس از واکسیناسیون نوبت اول

شماره گروه	نوع تزریق	تعداد	نتیجه تست جلدی			میانگین تست پوستی پس از تزریق برحسب میلی لیتر
			قبل از تزریق	پس از تزریق		
				منفی	مثبت	
۱	ALi+BCG*	۴	Negative	۲	۲	۵/۵
۲	ALm+BCG**	۴	»	۱	۳	۸
۳	BCG	۴	»	۴	۰	۰
۴	Normal Saline	۴	»	۴	۰	۰
	جمع	۴	۱۶	۱۱	۵	۶/۷۵

نتیجه‌گیری : سرم های تهیه شده از تمامی سگ ها قبل و حداقل ۲ هفته پس از هر نوبت واکسیناسیون به روش IFA,ELISA و DA آزمایش گردیدند و با جمعیت کنترل مقایسه شدند که نتایج حاصله در تمامی گروههای چهارگانه منفی بوده است.

شترنگ ۵ - نتایج تاثیر واکسن های کشته لیشمانیا در گروههای مختلف سگ های تحت بررسی

شماره گروه	شماره سگ های تحت بررسی	نتایج تست سرولوژی ELISA		نتایج تست پوستی ۱۴۰ روز پس از واکسیناسیون	نتایج بررسی انگل شناسی بعد از تلقیح پروماستیگوت	
		بعد از تلقیح پروماستیگوت	قبل از تلقیح پروماستیگوت		اسمیر	کشت
I (ALi + BCG)	۱ ۲ ۳ ۴	- - - -	- - - -	- + + -	- - - -	- - - -
II (ALm + BCG)	۱ ۲ ۳ ۴	+ - - -	- - - -	- + + +	- - - -	- - - -
III (BCG alone)	۱ ۲ ۳ ۴	+ + + +	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
IV (Normal saline)	۱ ۲ ۳ ۴	+ + + +	- - - -	- + + -	+ + + +	+ + - -

کتابنامه

1- Bahar , K. ; Dowlati , Y. ; Shidani , B. (1996): Comparative safety and immunogenicity trial of two killed *Leishmania major* vaccine with or without BCG in human volunteers. Clinic in Dermatology , **14**: 486 - 495.

2- Edrissian , Ch.H. (1990): Kala-azar in Iran. Med. J. Islamic. Rep. Iran. **4**: 235-238.

3- Edrissian , Gh.H. (1996): Visceral leishmaniasis in Iran and the role of serological tests in diagnosis and epidemiological studies. In: M. Ali. Ozcel and M. Zia Alkan Parasitology for the 21 st century. CAB International 63 - 78.

4- Genaro , O. ; Costa , C.A. ; Pinto , J.A. et al (1996): Immunization of dogs as reservoir control for human disease. In : The clinical trials of killed *Leishmania major* vaccines symposium. 15-16 April. Jordan.

5- Monjour , L. (1988): Immunization of dogs with *Leishmania infantum* derived vaccine. Vet. Parasitol. **28**: 33-38.

6- Monjour , L. (1988): Vaccination and treatment trials against murine leishmaniasis with semi-purified Leishmania antigens. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. **86**: 412-415.

7- Tesh , R. (1995): Control of Zoontic visceral leishmaniasis, is it time to change strategies? Am. J. Trop. Med. Hyg. **52**: 287-292.

8- World Health Organization (1990): Control of the leishmaniasis WHO Technical Report Series. No. **793 , 158 ,** Geneva.