مجله بهداشت ایران
سال چهارم ، شماره ٤ ، زمستان ١٣٥٤

# استفاده از روش فلورسنت آنتی بادی در تشخیص سالك*

**زهرا زوین**
**دکتر غلامحسین ادریسیان****

خلاصه :

بمنظور بررسی ارزش روش ایمونوفلورسانس در تشخیص آزمایشگاهی سالك ۱۱۰ نفر که دارای زخمهای مشکوك بسالك بودند و برای آزمایش از نظر جسم لیشمان به دانشکده بهداشت وانستیتو تحقیقات بهداشتی معرفی‌شده بودند تحت بررسی قرار گرفتند.

از بیماران گسترشهائی از زخم و نمونه خون از نوك انگشت تهیه میشد . در گسترشهای تهیه شده با آزمایش میکروسکپی دقیق جستجوی جسم لیشمن و در پلاسمای جدا شده از نمونه خون با آزمایش فلورسنت آنتی بادی غیر مستقیم جستجوی پادتن با استفاده از آنتی ژنهای تهیه شده بعمل میآمد .

نتایج بدست‌آمده ازاین بررسی نشان دادکه آنتی ژن تهیه شده از اشکال تاژك‌دار کشته شده با فرمل و تغلیظ شده لیشمانیا دونوانی بهتر و بیشتر از سایر گونه‌های لیشمانیای مورد مصرف دراین بررسی میزان پادتن ایجاد شده بوسیله لیشمانیا تروپیکا را مشخص میکند .

دراین بررسی از ٦٧ مورد مثبت از نظر انگلی ٥١ مورد ( ٧٦٪ ) از نظر وجود پادتن با عیارهای $\frac{1}{16}$ تا $\frac{1}{1024}$ مثبت بودند . از ٤٣ موردکه انگل درآزمایش میکروسکپی آنها دیده نشده بود ٣٤ مورد از نظر وجود پادتن منفی بودند ، در دو مورد عیار پادتن کمتر از $\frac{1}{16}$ ( عیارهای غیر اختصاصی ) بود و در ٩ مورد پادتن با عیار های $\frac{1}{16}$ تا $\frac{1}{64}$ دیده شد .

این ٩ نفر افرادی بودندکه زخمهای یك تا ٧ ساله داشتندکه کهنه و چرکی شده بود . با توجه باینکه در زخمهای کهنه انگل کم و غیر قابل تشخیص میگردد . علت پیدا نکردن انگل دراین زخمها کم بودن تعداد آن‌ها بوده‌است و بطور کلی میتوان گفت استفاده از روش فلورسنت آنتی بادی در تشخیص سالك بیشتر در پیدا کردن این موارد کم انگل ارزش دارد .

از نمونه سرمهای تهیه شده از ٢١ نفرکه سابقه سالك نداشتند نمونه پادتن با عیار کمتر از $\frac{1}{16}$ که غیر اختصاصی تلقی میشود قابل تشخیص بود .

---

* این بررسی با استفاده ازاعتبارات دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه تهران واعتبارات طرحهای تحقیقات بهداشتی وزارت‌بهداری وسازمان‌برنامه انجام‌گرفته است.

** گروه اپیدمیولوژی وپاتوبیولوژی دانشکده‌بهداشت وانستیتو تحقیقات بهداشتی .

در تعدادی از نمونه‌های سرمی تهیه شده از بیماران مالاریائی ساکن بندرعباس که معمولا سابقه ابتلا بسالك ندارند آزمایش فلورسنت آنتی بادی با آنتی ژن لیشمانیا ــ دونوانی مثبت بود ، علت آن ممکنست وجود راکسیون سرولوژی مشابه بین مالاریا و لیشمانیوز باشد و یا اینکه افرادیکه از آنان نمونه سرم تهیه شده‌است بطور مکرر درمعرض نیش پشه خاکی آلوده بسایر انواع لیشمانیای بیماریزا قرارگرفته باشند .

مقدمــه :

در اکثر موارد بهترین روش تشخیص آزمایشگاهی سالك آزمایش میکروسکپی گسترش تهیه شده از محل ضایعه است ولی در مواردیکه زخم کهنه و چرکی شده باشد گاهی تعداد انگل بحدی کم میشود که در آزمایش میکروسکپی گسترش تهیه شده از زخم قابل تشخیص نیست ، در چنین مواردی یك روش مناسب سرولوژی ممکنست کمك زیادی به تشخیص زخمهای مشکوك بنماید .

در اکثر بررسیهای انجام شده در لیشمانیوز جلدی پادتن های موجود در جریان خون به وسیله متدهای کلاسیك سرولوژی مانند فیکساسیون کمپلمان (١) قابل تشخیص و اندازه‌گیری نبوده‌اند . روش ایمونوفلورسانس برای تشخیص آزمایشگاهی لیشمانیوز احشائی (کالا آزار ) روش با ارزشی است (٢) ولی در مورد لیشمانیوز جلدی نتایج متنوع و اغلب منفی داده‌است (٢) ، (٣) ، (٤) ، (٥) .

دراین بررسی سعی شده‌است ارزش روش ایمونوفلورسانس در تشخیص سالك با استفاده از آنتی ژنهای مختلف تهیه شده از لیشمانیا مورد بررسی قرارگیرد .

مــواد و روش کــار :

**الف ــ افــراد مورد مطالعه** ــ ١١٠ نفر بیمارانی‌که مورد آزمایش قرارگرفتند از مراکز مختلف پزشکی جهت آزمایش زخم از نظر سالك بدانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی معرفی شده بودند . عده‌ای ازاین افراد قبلا در آزمایشگاههای مختلف مورد آزمایش قرارگرفته بودند و نتایج آزمایشات انجام شده منفی گزارش شده بود .

از افراد تحت بررسی پس از جمع‌آوری اطلاعات لازم از نظر سن ــ جنس ــ تعداد زخم ــ سابقه درمان ــ محل سکونت ــ محل ابتلا ــ مدت ابتلا وسابقه ابتلا بسالك ، از محل زخم و یا زخمها ــ تعداد کافی گسترش روی لام تهیه و پس از رنگ‌آمیزی بروش گیمسا مورد آزمایش دقیق میکروسکپی قرار میگرفت . در مواردیکه زخم از نظر شکل ظاهری و مدت ابتلا و محل سکونت بیمار مشکوك بسالك بود ولی در گسترشهای تهیه شده در آزمایش مستقیم در دفعه اول جسم لیشمن دیده نمیشد با برداشت مجدد یك بار دیگر آزمایش میکروسکپی بعمل میآمد .

در هــر یك از آزمایشات گسترشهای تهیه شده در حدود نیمساعت و در اغلب موارد توسط دو نفر مورد آزمایش میکروسکپی دقیق قرار میگرفت تا حتی‌الامکان موارد کم انگل نیز مشاهده شوند . ضمن تهیه گسترش از زخم از هر یك از بیماران نمونه خون در داخل ٢ تا ٣ عدد لوله میکروهماتوکریت از نوك انگشت برداشت و پس‌از سانتریفوژ کردن پلاسمای آنها جدا میشد و تا موقع آزمایش سرولوژی در یخچال منهای ٢٠ درجه سانتیگراد نگهداری میگردید .

**ب ــ آنتی ژنهای مورد مصرف و روش تهیه آنها :** بــرای تهیه آنتی ژنها از سوشهای لیشمانیاتروپیکا ( اشکال بزرگ و کوچك ) و لیشمانیا دونوانی و لیشمانیای

بهداشتی استفاده شد . در دو نوع اول از قرصهای لپتومونائی و لیشمانیائی و درلیشمانیای مارمولك فقط از فرم لپتومونائی آنتی ژن تهیه شد .

برای تهیه آنتی ژن از اشکال تاژك‌دار سوشهای مورد استفاده در محیط N-N-N کشت داده میشد و پس از ۱۵ روز که معمولا تعداد انگل بحد کافی تکثیر پیدا میکرد مایع روی محیط کشت که حاوی اشکال تاژك‌دار انگل بود مستقیماً و یا پس از ۲ تا ۳ بار شستشو با آب نمك بافردار ( PBS دارای PH = ۷/۲ ) بکمك سانتریفوژ کردن ( ۲۰۰۰ دور در دقیقه بمدت ۱۰ دقیقه ) بکار میرفت . برای تهیه آنتی ژن کشته شده بوسیله فرمل بمایع روی محیط کشت به حجم مساوی محلول ۱ در صد فرمل در سرم فیزیولوژی Formol saline اضافه میشد و پس از ۵ دقیقه سه بار با PBS بصورت فوق شسته میشد . ازفرآورده‌های فوق‌الذکر بکمك سرنگ سوزن‌دار آنتی ژن بصورت قطراتی با فاصله معین ( ۱۲ قطره در دو ردیف ) روی لام تمیز و خشك قرار میگرفت .

برای تهیه آنتی ژن ازاشکال لیشمانیائی لیشمانیاتروپیکا اززخم قاعده دم سوری آلوده پس‌ازضد عفونی کردن زخم با الکل۷۰درجه و تراشیدن آن با کمك واکسینواستیل سوسپانسیونی از ماده حاصل از تراشیدن زخم در سرم فیزیولوژی تهیه و بصورت فوق روی لام قرار میگرفت .

در مورد لیشمانیا دونوانی طحال و کبدها مسترآلوده برش داده میشد و محل بریده شده با سطح لام با فاصله های مساوی تماس داده میشد .

لامهای آنتی ژن پس‌از خشك شدن ابتدا در کاغذ پوستی و بعد در کیسه نایلون بسته‌بندی میشد و بلافاصله در یخچال منهای ۷۰ درجه سانتیگراد تا موقع آزمایش قرار میگرفت . مشخصات سوشهائی که از آنها آنتی ژن تهیه شده‌است در جدول شماره (۱) خلاصه شده است .

**ج ــ روش آزمایش سرولوژی :** دراین بررسی از تکنیك فلورسنت آنتی بادی غیر مستقیم طبق روش Voller (٦) استفاده شده‌است . سرمهای مورد آزمایش ابتدا به نسبت های $\frac{1}{2}$ و $\frac{1}{4}$ و $\frac{1}{8}$ و $\frac{1}{16}$ رقیق میشد و رقتهای $\frac{1}{2}$ و $\frac{1}{16}$ مورد آزمایش قرار میگرفت و در صورتیکه مثبت بود رقتهای بالاتر نیز آزمایش میشد .

از سرم خون یکی از بیماران‌که مدت ٦ سال مبتلا به سالك بود بعنوان سرم شاهد مثبت یا سرم استاندارد استفاده شد .

دراین بررسی سرم کنژوگه Anti Human Immunoglobulin ساخت کارخانه Wellcome باغلظت $\frac{1}{20}$ پس از اضافه‌کردن ۱ تا ۲ قطره محلول ۱/٦٦ در صد اوانس بلو Evans blue بهر ۱ cc مصرف گردید .

برای خواندن نتیجه آزمایش از میکروسکوپ فلورسانس ارتولوکس ساخت کارخانه لایتز مجهز به لامپ جیوه‌ای و فیلترهای تحریکی UGI و BG12 و فیلتر های اکولر ٤٧٠ میکرون استفاده شد .

**نتایج بررسی :**

با توجه به عیار پادتن سرم استاندارد با آنتی ژنهای مختلف ( جدول شماره ۱ ) آنتی ژن مورد مصرف دراین بررسی آنتی ژن تهیه‌شده از شکل‌لپتومونائی لیشمانیادونوانی ( سوش شماره ۷ در جدول شماره ۱ ) کشته شده بوسیله فرمل و تغلیظ شده انتخاب شد که بالاترین عیار پادتن سرم استاندارد را نشان داد .

در آزمایش میکروسکوپی گسترشهای تهیه شده از زخم ١١٠ نفر مورد بررسی ، ٦٧ مورد (٦٠٪) از نظر وجود جسم لیشمن مثبت بودند . در آزمایش سرولوژی با روش فلورسنت آنتی بادی غیر مستقیم ٦٠ مورد (٥٤٪) از نظر وجود پادتن با عیار های $\frac{1}{16}$ تـا $\frac{1}{1024}$ مثبت بودند .

از ٦٧ مورد مثبت از نظر وجود انگل ٥١ مورد (٧٦٪) از نظر وجود پادتن با عیارهای $\frac{1}{16}$ تا $\frac{1}{1024}$ مثبت بودند .

عیار پادتن در موارد مثبت انگلی بقرار زیر بود :

عیار $\frac{1}{16}$ ١٧ مورد از ١٦ مورد بقیه در ٤ مورد عیار پادتن کمتر از $\frac{1}{16}$

عیار $\frac{1}{32}$ ١٣ مورد (عیارهای غیر اختصاصی) بود ودر١٢ موردپادتن دیده‌نشد .

عیار $\frac{1}{64}$ ١٨ مورد

عیار $\frac{1}{512}$ ١ مورد

عیار $\frac{1}{1024}$ ٢ مورد

از ٤٣ مورد که انگل در آزمایش میکروسکپی گسترشهای تهیه شده از زخـم آنان دیده نشد ٣٤ مورد از نظر وجود پادتن نیز منفی بـودند در مورد عیار پادتن $\frac{1}{4}$ ( عیار غیر اختصاصی ) بـود و در ٩ مـورد پادتن با عیار $\frac{1}{16}$ تا $\frac{1}{64}$ ($\frac{1}{16}$ سه مورد ، $\frac{1}{31}$ چهار مورد ، $\frac{1}{64}$ دو مورد ) دیده شد .

بحث :

با توجه به نتایج بدست آمده از آزمایش سرم استاندارد با آنتی ژنهای مختلف (جدول شماره ١) نتیجه‌گرفته میشود که بهترین آنتی ژن دراین بررسی آنتی ژن تهیه شده از لیشمانیا دونوانی بوده‌است ــ این نوع لیشمانیا چه بصورت اشکال تاژکدار در محیط N-N-N و چه بصورت اجسام لیشمن در طحال وکبدها مستر آلوده بالاترین عیار پادتن را با سرم استاندارد و سایر سرمهای مثبت نشان داد . آنتی ژن تهیه شده از اشکـال لپتومونائی کشته شده بوسیله فرمل و تغلیظ شده لیشمانیا دونوانی ازسایر آنتی ژنهای تهیه شده از همین انگل که دراین بررسی مورد استفاده قرارگرفته‌اند بهتر است ، چون تهیه اشکال لپتومونائی انگل در محیط کشت ساده‌تر بوده و کشتن آن بوسیله فرمل از خطر آلودگی آن میکاهد و تاحدی هم انگل را فیکسه میکند و تغلیظ انگل خـواندن نتیجه آزمایش را آسانتر و سریعتر مینماید . وقتی مستقیماً از مایع روی کشت آنتی ژن تهیه میشود شکل انگلها مشخص‌تر است . سوشهای لیشمانیا دونوانی جدا شده از انسان و سگ بعنوان آنتی ژن دراین بررسی نتایج مشابه نشان دادند . اصولا لیشمانیا دونوانـی نسبت بسایر انواع لیشمانیای بیماریزا برای انسان ایجاد پادتن بیشتری مینماید و چنانکه ایـن بررسی هم نشان داده‌است در آزمـایش فلورسنت آنتی بادی لیشمانیا دونوانـی بعنوان آنتی ژن بهتر از سایر انواع لیشمانیا میزان پادتن ایجاد شده بوسیله لیشمانیا تروپیکا را مشخص میکند . بموجب این بررسی تاحدی میتوان گفت از نظر آنتی ژنی‌سیته سوش

اصفهان ( نوع روستائی ) بهتر از سوش تهران ( نوع شهری ) بوده‌است .

دراین بررسی از ٦٧ مورد که از نظر انگل مثبت بودند ، ٥١ مورد در آزمایش سرولوژی نتیجه مثبت نشان دادند در ٤ مورد عیار پادتن کمتر از $\frac{1}{16}$ و غیر اختصاصی بود ولی در ١٢ مورد باوجود ابتلا بسالك و وجود انگل در زخم آزمایش سرولوژی منفی بوده‌است . ازاین ١٢ مورد ١٠ مورد آنان افرادی بودندکه طول مدت ابتلا آنان بین ٢ تا ٤ ماه بوده‌است ، شاید دراین موارد مدت ابتلا کافی برای بوجود آمدن پادتن قابل تشخیص بروش فلورسنت آنتی بادی نبوده‌است و یا در عده‌ای ازافرادمبتلا بسالك این نوع پادتن‌ها بوجود نمیآید و یا سوش مورد استفاده در تهیه آنتی ژن دارای آنتی ژنهائیکه در مراحل اولیه بیماری تولید پادتن میکنند نمیباشد .

از ٤٣ موردی‌که در آزمایش میکروسکپی زخم آنان انگل دیده نشد ٩ مورد از نظر سرولوژی با روش فلورسنت آنتی بادی مثبت بودند . این عده افرادی بودند که زخمهای یك تا هفت ساله داشتندکه در اکثر موارد زخم چرکی شده بود و با توجه باینکه معمولا در زخمهای کهنه و چرکی سالك تعداد انگل بحدی کم میشودکه با آزمایش معمولی میکروسکپی قابل تشخیص نیست میتوان گفت علت پیدا نکردن انگل در اکثر این موارد کم بودن تعداد جسم لیشمن در زخم بوده است .

در بین ٢١ نفر که سابقه ابتلا بسالك نداشتند و نمونه خون آنان برای تهیه سرم شاهد منفی مورد آزمایش قرار میگرفت در ٦ نفرنتیجه آزمایش با عیار کمتر از $\frac{1}{16}$ که معمولا غیر اختصاصی و منفی تلقی میشود (٧) ، مثبت بود همچنین دراین بررسی تعداد ٥٧ نمونه سرم تهیه شده از افراد مالاریائی در بندرعباس مورد آزمایش قرارگرفت که در ٢٣ مورد (٤٠٪) آزمایش فلورسنت آنتی بادی با آنتی ژن تهیه شده از اشکال تاژك‌دار لیشمانیا دونوانی کشته شده بوسیله فرمل و تغلیظ شده با عیار $\frac{1}{16}$ تا $\frac{1}{64}$ (١٥ مورد $\frac{1}{16}$ و ٦ مورد $\frac{1}{32}$ و دو مورد $\frac{1}{64}$) مثبت بودند .

علت مثبت بودن این‌نمونه‌هاکه از منطقه غیربومی سالك تهیه شده بود ، ممکنست وجود راکسیون سرولوژی مشابه بین سالك و مالاریا باشد و یا ساکنین این منطقه در معرض نیش پشه خاکی آلوده بسایر انواع لیشمانیای غیر بیماریزا برای انسان قرارگرفته باشند (٨) روشن شدن این موضوع احتیاج به بررسی بیشتر دارد .

بطور کلی میتوان گفت آزمایش فلورسنت آنتی بادی با استفاده از آنتی ژن تهیه شده از لیشمانیا دونوانی در تشخیص زخمهای کهنه و چرکی سالك که معمولا درآزمایش میکروسکپی آنها انگل دیده نمیشود کمك قابل ملاحظه‌ای میکند . برای تعیین ارزش واقعی آن لازم است این بررسی درزخمهای کهنه و چرکی توأم با درمان اختصاصی سالك پی‌گیری شود .

بنظر میرسد لااقل قسمتی از پادتن های قابل تشخیص با روش فلورسنت آنتی بادی در سالك محافظت‌کننده Protective نباشند ، چون در بیماری که از خون او سرم شاهد مثبت ( سرم استاندارد ) دراین بررسی تهیه شد و عیار پادتن دراین نمونه سرم $\frac{1}{1024}$ ، یعنی بالاترین عیار بدست آمده دراین بررسی بود ، باوجودیکه بیماری او مدت ٦ سال طول کشیده بود (٩) ، در موقع تهیه سرم تعداد نسبتاً زیادی انگل در گسترش تهیه شده از زخمهای وسیع بدن او دیده میشد . □

سپاسگزاری ــ از راهنمائی و کمك استاد محترم جناب آقای دکتر ابوالحسن ندیم و همکاری بیدریغ آقای قسمت‌الله تحویلدار بیدرونی کارمند واحد اپیدمیولوژی برای در اختیار گذاشتن سوشهای لیشمانیا ، و کمك مؤثر آقایان نصرت‌الله اسعد و عباس افشارکارمندان واحد تك یاخته شناسی دانشکده بهداشت وانستیتو تحقیقات بهداشتی صمیمانه تشکر میشود .

## REFERENCES

1. Jeanselme (M.E.), 1914, Leishmaniose cutance et reaction de wassermann. Trop. Dis. Bill., 4,402.
2. Shaw, J. J. & Voller, A. (1964), the detection of circulating antibody to to Kala-azar by mean of immunofluorescent technique. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg. 58(4), 349-59.
3. Oddo, F. G. & Casio, G. (1964), the immunofluorescent test in visceral and cutaneous leishmaniasis. Trop. Dis. Bull., 61, 258.
4. Quilici, M., Dunan, S. & Ranque, J., (1968), Immunofluorescence in Leishmaniasis. Comparison with the complement fixation reaction-Med. Trop., 28(1).
5. Rezai, H. R. Behforouz, N. and Gettner, S. (1975), antibodies in cutaneous leishmaniasis, Proceding of the First National Seminar on Parasitic diseases 1-3 July, 1974. Tehran, Iran. J. Pub. Hlth. 4, 81.
6. Voller, A., & O'Neill, P., (1971), immunofluorescence method suitable for large scale application to malaria — Bull. Wld. Hlth. org., 45, 524-529.
7. Walton, B., Brooks, Wè Hè & Arjona, I., (1972), serodiagnosis of American-leishmaniasis by indirect fluorescent antibody test. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 21(3), 269-9.
8. Edirissian, G. H. Nadim, A., Sanati, A., and Afshar, A. (1971), the immunological relationship between leishmania tropica (Major) and Reptilian leishmania., Parasitologia XIII(3), 411-13.
9. Nadim A. (1974), the problem of case with very long duration in cutaneous leishmaniasis, Third International congress of parasitology, 1-Munchen, 25-31 August, 242, 243.
10. Javadian, E., Nadim, A., (1975), studies on cutaneous leishmaniasis in Kusestan province, south-west of Iran (1963-1975)., Second Asian Congress of Agricultural Medicine and Rural Health. 21-24 April, 1975, Tehran, Iran.

## جـــدول شماره ۱

### مشخصات آنتی ژنهای تهیه شده از لیشمانیا جهت بررسی سرولوژی سالک بروش فلورسنت آنتی بادی

| ردیف | نوع لیشمانیا | محل تهیه سوش | میزبان | تاریخ برداشت از میزبان | محیط نگهداری در آزمایشگاه | تهیه لام آنتی ژن از : | عیار سرم استاندارد با آنتی ژنهای |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ۱ | لیشمانیا تروپیکا (سوش روستائی) | اصفهان | انسان | ۲ سال قبل | N-N-N | شکل لپتومونائی مستقیما از مایع روی محیط کشت | ۱/۴ |
| ۲ | لیشمانیا تروپیکا (سوش شهری) | تهران | انسان | ۲/۵ سال قبل | N-N-N | شکل لپتومونائی مستقیما از مایع روی محیط کشت | — |
| ۳ | لیشمانیا تروپیکا (سوش خوزستان) | موسیان خوزستان | انسان | ۲ سال قبل | موش سوری | شکل لیشمانیائی از زخم لیشمانیوز جلدی | — |
| ۴ (۹) | لیشمانیا تروپیکا | " " | انسان | اولین پاساژ | N-N-N | شکل لپتومونائی کشت شده بوسیله فرمل و تغلیظ شده | ۱/۱۶ |
| ۵ * | لیشمانیا تروپیکا | " " | انسان | ۲ سال قبل | موش سوری | شکل لپتومونائی کشته شده بوسیله فرمل و تغلیظ شده | ۱/۱۶ |
| ۶ | لیشمانیا دونوانی | سنندج | انسان | ۵/۰ سال قبل | N-N-N | شکل لپتومونائی مستقیما از مایع روی محیط کشت | ۱/۲۵۶ |
| ۷ | لیشمانیا دونوانی | سنندج | انسان | ۵/۰ سال قبل | N-N-N | شکل لپتومونائی کشت شده بوسیله فرمل و تغلیظ شده | ۱/۱۰۲۴ |
| ۸ | لیشمانیا رونوانی | دروس | سگ | ۶/۰ سال قبل | N-N-N | شکل لپتومونائی مستقیما از مایع روی محیط کشت | ۱/۲۵۶ |
| ۹ | لیشمانیا دونوانی | دروس | سگ | ۶/۰ سال قبل | N-N-N | شکل لپتومونائی کشته شده بوسیله فرمل و تغلیظ شده | ۱/۰۲۴ |
| ۱۰ | لیشمانیا دونوانی | قزوین | انسان | ۸/۰ سال قبل | هامستر | شکل لیشمانیائی از طحال حیوان آلوده | ۱/۱۰۲۴ |
| ۱۱ | لیشمانیا مارمولك | مشهد | مارمولك | ۶/۰ سال قبل | N-N-N | شکل لپتومونائی کشته شده بوسیله فرمل و تغلیظ شده | ۱/۱۶ |
| ۱۲ | لیشمانیا مارمولك | اهواز | مارمولك | ۱/۰ سال قبل | N-N-N | شکل لپتومونائی کشته شده بوسیله فرمل و تغلیظ شده | ۱/۱۶ |

ملاحظات :

* آنتی ژن شماره ۵ از اولین پاساژ انگل که از زخم سوری به محیط کشت برده شده بود تهیه شد .