

Effect of methanolic extract of hawthorn (*Crataegus aronia*) fruit on *Leishmania major* in vitro

Maroufi Y^{1*}, Dabirzadeh M², Hossein-Pour-Mousavi SH²

1- Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, I. R. Iran.

2- Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Zabol University of Medical Sciences, Zabol, I. R. Iran.

Received May 6, 2015; Accepted January 30, 2016

Abstract:

Background: Pentavalent antimonate compounds are the routine drugs for leishmaniasis. Apart from side effects, relapse and drug resistance are among the main problems of these compounds. Hawthorn has antioxidant and antibacterial effects. The aim of present study was to determine the anti-leishmanial effect of hawthorn fruit extract in vitro.

Materials and Methods: In this experimental study different doses of hawthorn fruit extract was added to *Leishmania major* promastigotes. Cytotoxicity was investigated by both direct counting and MTT assay after 24, 48 and 72 hours. In addition, hawthorn extract was added to amastigote-infected macrophages and then the mean of amastigote per macrophage was counted after 24 and 48 hours. Data were analyzed using one-way ANOVA.

Results: The cytotoxicity of the highest and lowest concentration of the extract (60 µg/ml and 0.5 µg/ml) after 24, 48 and 72 hours was 31.86%, 27.93%; 20.11%, 20.94%; and 35.19%, 55.14%, respectively. After 24 hours the IC₅₀ was 49.13 µg/ml; the mean number of amastigote per macrophage in Control and Plant extract-treated groups (1, 10 and 100 µg/ml) were: 3.91; (1.97, 1.76 and 1.78), respectively.

Conclusion: The results showed that hawthorn fruit extract has no significant cytotoxic effect on promastigotes. However, to some extent it can inhibit the proliferation of amastigotes inside macrophages.

Keywords: Hawthorn, *Leishmania major*, Promastigote, Amastigote

* Corresponding Author.

Email: maroufi.y@gmail.com

Tel: 0098 918 375 5825

Fax: 0098 873 366 4674

Conflict of Interests: *No*

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, April, 2016; Vol. 20, No 1, Pages 11-15

بررسی تاثیر عصاره متانولی میوه زالزالک بر لیشمانیا ماژور در شرایط برون تنی

یحیی معروفی^{۱*}، منصور دبیرزاده^۲، سید حسن حسین پور موسوی^۳

خلاصه:

سابقه و هدف: ترکیبات پنج ظرفیتی آنتیموان داروی رایج لیشمانیوز هستند. علاوه بر عوارض جانبی، عود و مقاومت دارویی از مشکلات اصلی این داروهاست. زالزالک دارای خواص آنتی اکسیدانی و ضد باکتریایی است. هدف از تحقیق حاضر بررسی تاثیر ضد لیشمانیایی عصاره میوه زالزالک در شرایط آزمایشگاهی می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی عصاره زالزالک با غلظت های مختلف به پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور افزوده شد. بعد از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، میزان کشتندگی با دو روش شمارش مستقیم و روش رنگ سنجی MTT بررسی شد. همچنین، عصاره زالزالک به ماکروفاژ آلوده به آماسیتیگوت انگل افزوده شد و پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت، میانگین تعداد آماسیتیگوت در ماکروفاژ آلوده محاسبه گردید.

نتایج: میزان کشتندگی بیشترین و کمترین غلظت ($60 \mu\text{g/ml}$ و $0/5$) به ترتیب بعد از گذشت ۲۴ ساعت، $31/86$ و $27/93$ درصد، بعد از ۴۸ ساعت، $20/11$ و $20/94$ درصد و بعد از ۷۲ ساعت، $35/19$ و $55/14$ درصد بود. IC_{50} بعد از ۲۴ ساعت، $49/13 \mu\text{g/ml}$ به دست آمد. میانگین تعداد آماسیتیگوت در هر ماکروفاژ پس از ۲۴ ساعت در گروه های کنترل، زالزالک با غلظت های 1 ، 10 و 100 به ترتیب $3/91$ ، $1/97$ ، $1/76$ و $1/78$ محاسبه گردید.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که اگرچه عصاره میوه زالزالک اثر کشتندگی چندانی بر پروماستیگوت ندارد ولی تا حدودی مانع از تکثیر آماسیتیگوت در داخل ماکروفاژ می شود.

واژگان کلیدی: زالزالک، لیشمانیا ماژور، پروماستیگوت، آماسیتیگوت

دو ماهنامه علمی- پژوهشی فیض، دوره بیستم، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۵، صفحات ۱۵-۱۱

مقدمه

به دلیل عوارض جانبی این داروها، احتمال عود بیماری و به جا ماندن جوشگاه تحقیقات زیادی در جهت ابداع و ارزیابی روش های مختلف درمانی لیشمانیوز، به خصوص استفاده از گیاهان دارویی، در حال انجام است. گیاهان بومی به دلیل در دسترس بودن و مقرون به صرفه بودن در اکثر این تحقیقات استفاده شده است [۱-۸]. درخت زالزالک (*Crataegus aronia*) به صورت وحشی و خودرو در مناطق شمال، شمال غرب و غرب ایران یافت می شود. قرن هاست که از میوه این گیاه به عنوان غذا و دارو در چین و اروپا استفاده می شود. گرچه تاکنون داده ای مبنی بر بررسی اثر زالزالک بر لیشمانیا و لیشمانیوز ثبت نشده است، اما مطالعات زیادی اثرات آنتی اکسیدانی، ضد التهابی، ضد ویروسی و ضد باکتریایی این گیاه را نشان داده اند. این گیاه دارای ترکیبات پلی فنلی زیادی است که علاوه بر خواص ضد باکتریایی و ضد التهابی، مقاومت دارویی در عوامل بیماری زا را هم سرکوب می کنند [۱۶-۱۱]. در اغلب کشورهای اروپایی به خصوص آلمان برای درمان بی نظمی ضربان قلب از گیاه زالزالک استفاده می شود. همچنین، زالزالک در درمان آنزین و تصلب شرایین (سفت شدن دیواره رگ ها) کاربرد دارد [۱۷]. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر کشتندگی عصاره میوه زالزالک بر لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی است.

لیشمانیا تک یاخته ایی تازک دار است که عامل بیماری لیشمانیوز است. علائم بالینی این بیماری به سه شکل جلدی، جلدی-مخاطی و احشایی می باشد [۳-۱]. لیشمانیوز یکی از شش بیماری مهم انگلی مناطق گرمسیری است که از سراسر جهان گزارش شده است [۴]. ایران برای لیشمانیوز جلدی اندمیک است [۵]. شایع ترین فرم لیشمانیوز نوع جلدی است که به دو صورت خشک (شهری) و مرطوب (روستایی) مشاهده می شود [۶]. هم اکنون در بسیاری از نقاط جهان تحقیقات گسترده ایی جهت درمان و کنترل این بیماری در حال انجام است [۷]. داروهای مورد استفاده در درمان لیشمانیوز ترکیبات ۵ ظرفیتی آنتیموان، گلوکانتیم و پنتوستام است.

^۱ استادیار، گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان
^۲ استادیار، گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زابل
^۳ دانشجوی کارشناسی ارشد انگل شناسی پزشکی، گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زابل

* نشانی نویسنده مسئول:

سندج، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی

تلفن: ۰۹۱۸۳۲۷۵۵۸۲۵ | دورنویس: ۰۸۷۳ ۳۶۶۴۶۷۴

پست الکترونیک: maroofi.y@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۲/۱۶ | تاریخ پذیرش نهایی: ۹۴/۱۱/۱۰

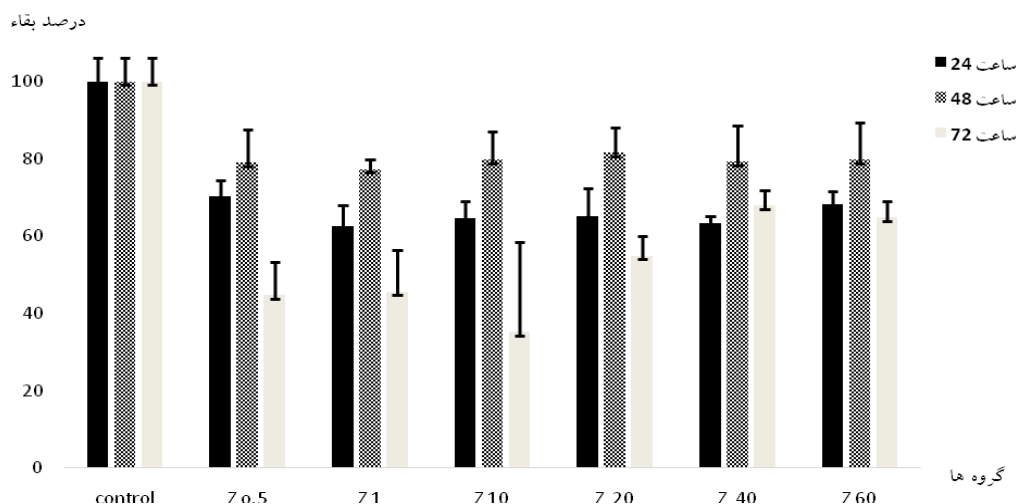
مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۳ در آزمایشگاه انگل شناسی دانشگاه علوم پزشکی زابل انجام شد. لیشمانیا ماژور سویه MRHO/IR/75/ER از دانشگاه تربیت مدرس تهیه شد. سپس، در محیط RPMI ۱۶۴۰ و سرم جنین گاوی (FCS) ۱۰ درصد (غیر فعال شده با حرارت) و دمای °C ۲۱ کشت داده شد. میوه زالزالک از ارتفاعات جنگلی منطقه مازندران جمع‌آوری گردید. بعد از خشک شدن در محیط مناسب و فاقد نور، عصاره گیری به روش پرکولاسیون با استفاده از متانول ۸۰ درصد انجام شد. سپس، در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و فشار کم با استفاده از دستگاه روتاری اوپورین (IKA WERKE; RVO6-ML) حلال تبخیر شده و عصاره تغلیظ شد. پس از خشک شدن، عصاره بسته بندی شده و در دمای صفر درجه سانتی‌گراد و تاریکی تا انجام آزمایشات نگهداری شد. از عصاره به دست آمده غلظت‌های $\mu\text{g/ml}$ ۰/۵، ۱، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰ تهیه شد. سپس، 10^6 cell/ml پروماستیگوت که در فاز لگاریتمی قرار داشتند، به همراه غلظت‌های تهیه شده از زالزالک در پلیت کشت ۹۶ خانه-ای و دمای °C ۲۱ انکوبه شد. تعدادی از چاهک‌ها فقط حاوی انگل بود که به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شدند. تمام گروه‌ها به-صورت ۴ بار تکرار انجام گرفت. اثر عصاره گیاه بر میزان کشندگی انگل پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با روش شمارش مستقیم و روش رنگ‌سنجی MTT تعیین شد. MTT (3-(4,5-dimethyl thiazolyl-2)-2,5-diphenyle tetrazolium bromide) یک روش رنگ‌سنجی است که طی آن نمک ترازولیوم تحت تاثیر آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی به یک ماده نامحلول بنام فورامازان تبدیل می‌گردد. سلول‌های مرده قادر به انجام این عمل نمی‌باشند [۱۸]. محلول MTT با غلظت نهایی ۰/۵ mg/ml به هر چاهک اضافه شد و مجدداً پلیت به مدت ۴ ساعت در تاریکی و دمای °C ۲۱ انکوبه شد. سپس، ۱۰۰ ml محلول DMSO به هر چاهک افزوده شد و ۱۰ دقیقه بعد جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۶۲۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر قرائت شد [۱۸]. برای بررسی اثر عصاره زالزالک بر آماستیگوت لیشمانیا از ماکروفازهای صفافی موش سوری استفاده شد. لامل‌های گرد استریل در ته چاهک‌های پلیت ۱۲ خانه گذاشته شد و تعداد 5×10^4 ماکروفاز در محیط

کشت RPMI 1640 به همراه FCS ۱۰ درصد و جنتامایسین ۰/۵ درصد و دمای °C ۳۷ و CO₂ ۵ درصد کشت داده شد. ۲۴ ساعت بعد، به هر چاهک 5×10^5 پروماستیگوت انگل که در فاز ایستایی قرار داشتند، افزوده شد [۱۹]. بعد از گذشت ۲۴ ساعت محلول رویی خالی شده و محیط کشت جدید به همراه غلظت-های $\mu\text{g/ml}$ ۱، ۱۰ و ۱۰۰ از عصاره زالزالک به چاهک‌ها افزوده شد. ماکروفاز آوده بدون عصاره گیاه به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد. در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از افزودن دارو، لامل‌ها از چاهک خارج گشته و پس از فیکس کردن با متانول با روش گیمسا رنگ آمیزی شدند و با میکروسکوپ نوری تعداد آماستیگوت‌ها در ۱۰۰ ماکروفاز شمارش گشته و متوسط تعداد آماستیگوت در هر ماکروفاز در گروه‌های محاسبه گردید. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۶ و آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (one-way ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج

میزان کشندگی غلظت‌های $\mu\text{g/ml}$ ۰/۵، ۱، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰ در پروماستیگوت‌ها بعد از ۲۴ ساعت به ترتیب ۲۹/۷۳، ۳۷/۴۴، ۳۵/۴۰، ۳۴/۷۷، ۳۶/۶۵، ۳۱/۸۶ درصد بود. این مقادیر پس از ۴۸ ساعت به ترتیب ۲۰/۹۴، ۲۲/۶۵، ۲۰/۱۵، ۱۸/۳۶، ۲۰/۶۵، ۲۰/۱۱ درصد و پس از ۷۲ ساعت به ترتیب ۵۵/۱۴، ۵۴/۳۱، ۶۴/۸۴، ۴۵/۰۶، ۳۲/۰۲، ۳۵/۱۹ درصد بود. در نمودار شماره ۱ درصد بقاء (که با کم کردن درصد کشندگی از ۱۰۰ به-دست آمده) نشان داده شده است. IC₅₀ بعد از ۲۴ ساعت، $\mu\text{g/ml}$ ۴۹/۱۳ به دست آمد. بعد از گذشت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تمامی گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های زالزالک با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری داشتند ($P < 0/05$). متوسط تعداد آماستیگوت در هر ماکروفاز در گروه‌های کنترل و زالزالک $\mu\text{g/ml}$ ۱، ۱۰ و ۱۰۰ بعد از گذشت ۲۴ ساعت به ترتیب ۳/۹۱، ۱/۹۷، ۱/۷۶ و ۱/۷۸ و بعد از ۴۸ ساعت به ترتیب ۱/۱۷، ۱/۱۵ و ۰/۷ بود (جدول شماره ۱). بعد از ۲۴ ساعت گروه‌های تیمار شده با گروه کنترل اختلاف معنی‌دار داشت. بعد از ۴۸ ساعت تنها گروه زالزالک $\mu\text{g/ml}$ ۱۰۰ با گروه کنترل اختلاف معنی‌دار داشت ($P < 0/05$).



نمودار شماره ۱- درصد بقاء در پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور تحت تاثیر عصاره زالزالک با غلظت‌های مختلف پس از سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

غلظت‌های مختلف از $100 \mu\text{g/ml}$ تا 1 mg/ml بر باکتری‌های گرم مثبت نشان داده شده است [۲۰، ۱۵، ۱۲، ۱۱]. ما نیز در مطالعه اولیه از غلظت‌های بالا یعنی 1 mg/ml استفاده کردیم، ولی مشخص شد که تنها غلظت‌های پایین‌تر از $100 \mu\text{g/ml}$ اثر کشندگی بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور داشتند. اسدی و همکاران اثر عصاره هیدروالکلی چای کوهی و برگ ازگیل را بر روی پروماستیگوت لیشمانیا ماژور در شرایط برون‌تنی بررسی کرده‌اند و کشندگی عصاره این گیاهان را در پروماستیگوت‌های لیشمانیا گزارش کرده‌اند [۲۱]. هم‌چنین شریعتی‌فر و همکاران اثربخشی عصاره ازگیل بر لیشمانیازیس جلدی در موش سوری را گزارش کرده‌اند [۲۲]. در یک مطالعه دیگر اثر ضدلیشمانیایی عصاره گل گاوزبان و اسپند هم در پروماستیگوت و هم در آماسیتگوت گزارش شده است [۲۳].

نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که اگرچه عصاره میوه زالزالک اثر کشندگی چندانی بر پروماستیگوت ندارد، ولی تاحدودی مانع از تکثیر آماسیتگوت در داخل ماکروفاژ می‌شود.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر در قالب پایان‌نامه دانشجویی برای دریافت درجه کارشناسی ارشد می‌باشد. بدین‌وسیله، نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زابل اعلام می‌دارند.

جدول شماره ۱- میانگین تعداد آماسیتگوت در هر ماکروفاژ پس از

زمان گروه‌ها	گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت $\bar{X} \pm SD$	
	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت
کنترل	$3/91 \pm 0/34$	$1/11 \pm 0/16$
Zal1	$1/97 \pm 0/16$	$1/17 \pm 0/14$
Zal10	$1/76 \pm 0/17$	$1/15 \pm 0/16$
Zal100	$1/78 \pm 0/19$	$0/7 \pm 0/13$

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که پس از ۲۴ ساعت تمامی گروه‌ها با گروه کنترل اختلاف معنی‌دار داشتند، ولی در بین خود گروه‌ها تنها گروه‌های ۰/۵ و ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر اختلاف معنی‌دار داشتند. بعد از ۴۸ ساعت هیچ‌کدام از گروه‌های زالزالک اختلاف معنی‌دار باهم نداشتند. پس از ۷۲ ساعت گروه‌های ۰/۵ و ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر با غلظت‌های بالا ($40 \mu\text{g/ml}$ و $60 \mu\text{g/ml}$) اختلاف معنی‌دار داشتند. اثر عصاره زالزالک بر تکثیر آماسیتگوت در ماکروفاژهای صفاقی موش بعد از ۲۴ ساعت کاملاً مشهود بود، ولی بعد از ۴۸ ساعت این اثر تنها در گروه زالزالک $100 \mu\text{g/ml}$ مشاهده شد. این تحقیق اولین مطالعه در رابطه با اثر کشندگی عصاره میوه زالزالک بر لیشمانیا است و تاکنون داده‌ای مبنی بر اثر کشندگی زالزالک بر لیشمانیا و انگل‌های دیگر ثبت نشده است. بااین‌وجود، در تحقیقات دیگران اثرات ضدباکتریایی و ضدویروسی زالزالک مشخص شده است. اثرات کشندگی عصاره زالزالک با

References:

- [1] Singh N, Kumar M, Singh RK. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pac J Trop Med* 2012; 5(6): 485-97.
- [2] Hepburn NC. Cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol* 2000; 25(5): 363-70.
- [3] Postigo JA. Leishmaniasis in the World Health Organization Eastern Mediterranean Region. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 36 Suppl 1: 62-5.
- [4] Bermann JD. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin Infect Dis* 1997; 24(4): 684-703.
- [5] Athari A, Jalallu N. Epidemiological survey of cutaneous leishmaniasis in Iran 2001-2005. *Sci J Isfahan Univ Med Sci* 2006; 24(82): 8-13. [in Persian]
- [6] Hewardt BL. Leishmaniasis. *Lancet* 1999; 354(9185): 1191-9.
- [7] Moskowit PF, Kurban AK. Treatment of cutaneous leishmaniasis: retrospectives and advances for the 21st century. *Clin Dermatol* 1999; 17(3): 305-15.
- [8] Santos DO, Coutinho CE, Madeira MF, Bottino CG, Vieira RT, Nascimento SB, et al. Leishmaniasis treatment-a challenge that remains: a review. *Parasitol Res* 2008; 103(1): 1-10.
- [9] Saldanha AC, Romero GA, Merchan-Hamann E, Magalhães AV, Macedo Vde O. A comparative study between sodium stibogluconate BP 88R and meglumine antimoniate in the treatment of cutaneous leishmaniasis. I. The efficacy and safety. *Rev Soc Bras Med Trop* 1999; 32(4): 383-7.
- [10] Kobets T, Grekov I, Lipoldova M. Leishmaniasis: prevention, parasite detection and treatment. *Curr Med Chem* 2012; 19(10): 1443-74.
- [11] Benmalek Y, Yahia OA, Belkebir B, Fardeau ML. Anti-microbial and anti-oxidant activities of *Illicium verum*, *Crataegus oxyacantha* ssp *monogyna* and *Allium cepa* red and white varieties. *Bioengineered* 2013; 4(4): 244-8.
- [12] Djeddi S, Boutaleb H. Evaluation of antioxidative and antibacterial potentials of *Crataegus monogyna* Jacq. from Mahouna mountain (Algeria). *J Advanced Sci Applied Engineering* 2014; 1(1): 60-3.
- [13] Kao ES, Wang CJ, Lin WL, Yin YF, Wang CP, Tseng TH. Anti-inflammatory potential of flavonoid contents from dried fruit of *crataegus pinnatifida* in vitro and in vivo. *J Agric Food Chem* 2005; 53(2): 430-36.
- [14] Shahat AA, Cos P, De Bruyne T, Apers S, Hammouda FM, Ismail SI, et al. Antiviral and antioxidant activity of flavonoids and proanthocyanidins from *Crataegus sinaica*. *Planta Med* 2002; 68(6): 539-41.
- [15] Kostic DA, Velickovic JM, Mitic SS, Mitic MN, Randelovic SS. Phenolic Content, and Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Crataegus Oxyacantha L (Rosaceae)* Fruit Extract from Southeast Serbia. *Trop J Pharm Res* 2012; 11(1): 117-24.
- [16] Ignat I, Radu DG, Volf I, Pag AI, Popa VI. Antioxidant and antibacterial activities of some natural polyphenols. *Cell Chem Technol* 2013; 47(5-6): 387-99.
- [17] Schüssler M, Hölzl J, Fricke U. Myocardial effects of flavonoids from *Crataegus* species. *Arzneimittelforschung* 1995; 45(8): 842-45.
- [18] Maroufi Y, Ghaffarifar F, Dalimi A, Sharifi Z, Hasan Z. A study on the cytotoxic effect of cantharidin on *Leishmania major* promastigote and amastigote survival in vitro. *Feyz* 2012; 16(5): 406-13. [in Persian]
- [19] Maroufi Y, Ghaffarifar F, Dalimi A, Sharifi Z, Hassan Z. Cantharidin-induced apoptosis in *Leishmania major* promastigotes and macrophages infected by *Leishmania major* amastigotes in vitro. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2012; 22(89): 32-40. [in Persian]
- [20] Salmanian S, Sadeghi AR, Alami M, Ghorbani M. Phenolic Content, Antiradical, Antioxidant, and Antibacterial Properties of Hawthorn (*Crataegus elbursensis*) Seed and Pulp Extract. *J Agr Sci Tech* 2014; 16(2): 343-54.
- [21] Asadi M, Bahrami S, Ansari Samani R, Pakniat N. Effect of hydroalcoholic extracts of *Stachys lavandulifolia* Vahl and *Mespilus germanica* leaves on *Leishmania major*. *J Med Hormozgan* 2012 15(4): 279-84. [in Persian]
- [22] Shariatifar N, Rahimnia R, Jamshidi AM, Pirali Hamedani M, Shoeibi Sh. Effect of Ethanolic Extract of *Mespilus germanica* on Cutaneous Leishmaniasis in BALB/c Mice. *J Med Plans* 2010; 10(39): 76-81.
- [23] Yousefi R, Ghaffarifar F, Dalimi A. The Effect of *Alkanna tinctoria* and *Peganum harmala* Extracts on *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER) in vitro. *Iran J Parasitol* 2009; 4(1): 40-7.