جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة كربلاء –كلية التربية للعلوم الصرفة
قسم علوم الحياة

دراسة جزيئية ومناعية لطفيلي اللشمانيا الجلدية Cutaneous Leishmania في المحافظات الوسطى والجنوبية

أطروحة مقدمة إلى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة كربلاء وهي

جزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة

في علوم الحياة

من قبل

ازهار موسى جعفر الموسوي

ماجستير علوم حياة - جامعة كربلاء 2006

بكالوريوس علوم الحياة - جامعة الكوفة 1996

بإشراف

الأستاذ الدكتور : علي حسين الكبيسي

الأستاذ الدكتور : مهدي حسين العمّار

رجب 1436 هـ

نيسان 2015

O

(قَالُواْ سُبحَـٰنَكَ لَا عِلمَ لَنَا إِلَّا مَا
عَلَّمتَنَا إِنَّكَ أَنتَ ٱلعَلِيمُ ٱلحَكِيمُ)

ω

سورة البقرة (آية
32)

إقـــــرار المقوم اللغوي

أشهد أن هذه الرسالة الموسومة (الكشف عن بكتريا *Neisseria meningitidis* في سائل النخاع الشوكي والدم باستخدام تقنية الـPCR وفحص التلازن والزرع البكتيري) قد تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وصحح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير.

.

التوقيع:

الاسم : د . محمد حسين المهداوي

المرتبة العلمية: استاذ مساعد

مكان العمل: كلية التربية للعلوم الانسانية – جامعة كربلاء

التأريخ: / /2014

﴿ إقـــــــــــــرار لـجنـة الـمـنـاقـشـة ﴾

نحن أعضاء لجنة المناقشة الموقعين أدناه نشهد بأننا قد أطلعنا على الأطروحة الموسومة بـ **(دراسة جزيئية ومناعية لطفيلي اللشمانيا الجلدية Cutaneous Leishmania في بعض المحافظات الوسطى والجنوبية)** المقدمة من قبل الطالبة **(أزهار موسى جعفر الموسوي)** كجزء من متطلبات نيل درجة الدكتوراه فلسفة (علم الحيوان)، وبعد إجراء المناقشة العلنية وجد إنها مستوفية لمتطلبات الشهادة وعليه نوصي بقبول الأطروحة بتقدير ( ).

رئيس لجنة المناقشة

التوقيع:
الاسم: د.عبد الحسين حبش عواد
المرتبة العلمية: أستاذ
مكان العمل: جامعة البصرة / كلية التربية للعلوم الصرفة
التاريخ: / / 2015

عضو اللجنة

التوقيع:
الاسم: د.عبد النبي جويد عبد
المرتبة العلمية: أستاذ
مكان العمل: جامعة بابل / كلية العلوم للبنات
التاريخ: / / 2015

عضو اللجنة

التوقيع:
الاسم: **د.عبد علي جنزيل جبارة**
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد
مكان العمل: بغداد /كلية التربية ابن الهيثم
التاريخ: / / 2015

عضو اللجنة

التوقيع:
الاسم: **د.زهير محمد علي جدوع**
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد
مكان العمل: جامعة كربلاء/ كلية الطب
التاريخ: / / 2015

عضو اللجنة

التوقيع:
الاسم: **د.هيام عبد الرضا** كريم
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد
مكان العمل: جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة
التاريخ: / / 2015

المشرف

التوقيع:
الاسم: د.علي حسين مكي الكبيسي
المرتبة العلمية: أستاذ
مكان العمل: جامعة كربلاء / كلية طب الاسنان
التاريخ: / / 2015

المشرف

التوقيع:
الاسم: د.مهدي حسين العمّار
المرتبة العلمية: أستاذ
مكان العمل: جامعة الكوفة / كلية العلوم
التاريخ: / / 2015

التربـ

التوقيع:
الاسم: د.نجم عبد الحسين نجم
المرتبة العلمية: أستاذ
التاريخ: / / 2015

الإهداء

إلـى مـن لـه الرحمـة والرضـوان فـي ((جنـة عرضـها السموات والأرض أعدت للمتقين)). .....والدي

إلى ذاك الجسد الذي أتعبتـه الأيـام مـن اجـل راحتـي ، من وضع الله لها الجنة تحت قدميها .....أمي

إلى من كنتم ولا زلتم وبإذن الله السند في وقـت شـدتي .....اخوتي واخواتي

إلــى إشــراقة الأمــل وســر التحــدي وتــوأم روحــي .....اولادي (أديان و علي)

(اعتذاري لكم أحبتي ان كنت قد قصرت بعـض الشـيء بحقكم)

إلى.....كل من قدم لي عون أو نصيحة لإتمـام مشواري العلمي. إليهم جميعاً.....

اهدي ثمرة جهدي المتواضع

أزهـار

الموســـــوي

الشكر والتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على رسوله الأمين محمد بن عبد الله وعلى آله الطيبين الطاهرين وصحبه الغرّ الميامين .

يطيب لي وانا اطوي صفحات هذا البحث ان أتقدم بخالص شكري وتقديري إلى عَمادة كليـة التربيـة للعلـوم الصـرفة/ جامعـة كـربلاء ، والـى رئاسـة قسـم علـوم الحيـاة ، وإلـى أسـتاذيَ الفاضلين الأستاذ الدكتور على حسين مكي الكبيسي والأستاذ الدكتور مهدي حسين العمّار لما

أبدوه لي من عونٍ كبير في التوجيه العلمي وفي التعامل الشخصي خلال فترة الدارسة والبحث فلهم مني الشكر ومن الله الجزاء ، وإلى استشاري البحث الأستاذ الدكتور خليل إسماعيل في كلية الطب / جامعة البصرة والعاملين في مختبرات مستشفى الصدر الذين كرسوا جهودهم معي خلال فترة الدراسة الأولى والتدريب على تشخيص العينات ، والى جميع منتسبي مستشفيات المحافظات قيد الدراسة الذين كان لهم الفضل في تسيير متطلبات الدراسة والبحث والى زملاء الدراسة لتعاونهم معي كلما احتجت اليهم .

ومن دواعي الوفاء بالجميل ان اعرب عن شكري الى كل من الدكتورة رحاب جاسم محمد / كلية التربية للعلوم الصرفة – قسم الكيمياء ، والدكتور نصير مرزة حمزة / كلية التربية للعلوم الصرفة – علوم الحياة والى السيد الفاضل علي إسماعيل الجاف / المعهد الامريكي ، والسيد سعيد صبري سعيد / تقني تحليلات مرضية – مستشفى الاطفال لما ابدوه من مساعدة قيّمة لي في البحث .

الشكر الجزيل لكل من مد يد عون أو مساعدة أو نصيحة لي خلال فترة البحث والدراسة وفاتني ذكر اسمه.

الباحثـــــــــــــة

الخلاصة

تضمنت هذه الدراسة التعرف على انتشار داء اللشمانيا الجلدية والانواع التابعة له في بعض محافظات العراق حيث شملت العينات المرضى المراجعين لـ (مستشفى الكرامة و مستشفى الصدر التعليمي في محافظة بغداد ، مستشفى الحلة التعليمي ، مستشفى الحسين التعليمي ومستشفى عين التمر العام في كربلاء المقدسة، مستشفى الصدر في محافظة النجف الاشرف ، مستشفى الكرامة ومستشفى الزهراء التعليمي في محافظة واسط ، مستشفى الديوانية التعليمي ، مستشفى الحسين التعليمي العام في ذي قار ، مستشفى السماوة العام ، مستشفى الصدر العام في ميسان ، مستشفى الصدر التعليمي ومستشفى القرنة العام في محافظة البصرة) وللمدة من شهر تشرين الاول 2011 الى شهر اذار 2013 .

تعد الاصابة بداء اللشمانيّا الجلدية من المشاكل التي تواجه المرضى لأنها تسبب تشوهات في مكان الاصابة . شملت القرح 225 مريض ، تم بعدها تنمية الطفيلي في الوسط الزرعي NNN والوسط و RPMI-1640 .

اظهرت نتائج الدراسة تفوق اصابة الذكور (58.22%) على الاناث (41.77%) بفروق معنوية ، كما تفوق عدد المرضى المراجعين من المناطق الريفية (61.77%) في المحافظات اعلاه عن المرضى من المناطق الحضرية (38.22%) .

وبالنسبة لعدد القرح في الجسم تفوقت الاصابة بقرحة واحدة في الذكور اكثر من الاناث (58%) ثم بقرحتين (62%) ، أما حالة الاصابة بثلاث أو أربع قرح فكانت متقاربة في الاناث والذكور ، موزعة في مناطق الوجه على الاغلب (44%) ثم الاطراف السفلى (40.88 %) والعليا (14.66%) واقلها في منطقة الجذع سجلت اصابة واحدة فقط .

بينت الدراسة أن 46 مريضا (20.44%) لديهم الاصابة الجافة في حين سجلت الاصابة الرطبة 179حالة (79.55%) من المرضى .

ولغرض التشخيص الدقيق لأنواع اللشمانيا المنتشرة في بعض محافظات القطر استخدمت تقنية الـ PCR وشخصت العينات قيد الدراسة بظهور نوعين من الطفيلي المسبب للمرض حيث تم الحصول في الترحيل الكهربائي على حزمة بطول 560 bp تقريباً لـ 186 عينة تعود للنوع *Lieshmania.major* و39 عينة بحزمة مقدارها 750 bp تعود للنوع *Lieshmania.tropica* وعند دراسة العينات في محافظة كربلاء كانت عدد الاصابات 125

(عينة) لعام (2010-2011) بواقع 73 اصابة ولعام (2011-2012) 52 اصـابة بنسـبة 58.4 % و 41.6 % على التوالي ، توزعت على المناطق السكنية في المحافظـة : قضـاء عـين التمـر كانـت (40.8%) وهي الاكثر نسبة تليها ناحية الحسينية (23.2%) ثم ناحية الحر (13.6%) والاحيـاء الجنوبية (12.8%) ثم الاحياء الشمالية (5.6%) واخيرا مركز المحافظة (4%).

اظهر التشخيص الجزيئي بتفاعل البلمرة المتسلسل لعينات المحافظة اظهر وجود اللشمانيا المدارية *L. tropica* وكانت بنسبة (24.8%) وبواقع (17.6%) للذكور و (7.2%) للاناث ، واللشمانيا الكبرى *L. major* كانت الاصابة (75.2%) والنسبة بين الجنسين (44%) و (31.2%) للذكور والاناث على التوالي .

دلت الدراسة المناعية لامصال المرضى باللشمانيا الكبرى*L. major* وبتقنية الاليزا ELISA ارتفاع معدلات قيم الكلوبيولينات المناعية IgG و IgM أثناء الخمج بشكل ملحوظ مقارنة بمجموعة السيطرة ، ثم انخفضت تدريجيا بعد العلاج وكانت نسبة الجسم المضاد IgG (523.1 ± 1811.1 ملغم / د.لتر) والجسم المضاد IgM (23.6 ± 166.7 ملغم / د.لتر) وكذلك في المصابين باللشمانيا المدارية *L. tropica* كانت قيمة IgG (524.0 ± 1722.1 ملغم/ د.لتر) والجسم المضاد IgM (25.3 ± 182.9 ملغم / د.لتر) مقارنة بعينات السيطرة ، ثم انخفضت النسب بعد جرعات العلاج بعقار البنتوستام Pentostam .

أظهرت قيم المحركات الخلوية زيادة معنوية حيث بلغ الانترفيرون كاما (IFN-γ) للمرضى المصابين باللشمانيا الجلدية الكبرى (5.5±113.2 ملغم/د.لتر) أما بعد العلاج فكان هناك انخفاضاً معنوياً (3.0±6.05 ملغم /د.لتر) ، وكذلك الحال في اللشمانيا المدارية حيث كانت النسبة (6.5±88.2 ملغم /د.لتر) ولم تشكل فرق معنوي بعد المعاملة مع السيطرة .

وظهرت زيادة في معدلات المحرك الخلوي IL-10 حيث بلغت في الكبرى (9.8±215.0 ملغم /د.لتر) وبعد المعاملة كانت (5.1±9.02 ملغم / د.لتر) ، وفي عينات المدارية كانت النسبة (8.8±115.0 ملغم/د.لتر) ولم يظهر فرق معنوي بعد المعاملة مع عينات السيطرة .

وكمحاولة بسيطة لايجاد لقاح لهذا المرض تم استخلاص وتنقية المستضد السطحي لطفيلي اللشمانيا Lipophasphoglycan والمعروف كاحد عوامل الضراوة في الطور المسوط Promastigot ولقح بمجموعتين من الفئران من نوع (Bulb/c) من الذكور من المستضد المنقى

(مستضدات اللشمانيا المدراية واللشمانيا الكبرى) لدراسة الاستجابة المناعية من خلال اختبار التحول اللمفاوي ، فرط الحساسية المتأخر و اختبار البلعمة .

في اختبار التحول اللمفاوي كانت النسبة للمجموعة الاولى (المدارية) 6.5 % والثانية (الكبرى) 12.6 % وكان هناك فرق بمستوى معنوية $P< 0.05$ مع عينة السيطرة التي كانت النسبة فيها 4.7% . أما بالنسبة لاختبار فرط الحساسية المتأخر فقد كان معدل سمك الوسادة للقدم المحقنة بالمستضد والقدم المحقنة بمحلول الفينول – سلاين فقط (1.21 ± 0.20) ملم للمجموعة الاولى ، و (1.45 ± 0.10) ملم لحيوانات المجموعة الثانية ، اما لحيوانات السيطرة فقد بلغت (0.44 ± 0.05) ملم بفارق معنوي $P< 0.05$. وفي حساب النسبة المئوية لمجموع الخلايا الملتهمة كانت 17% ، 27.6% للمجموعتين الاولى والثانية على التوالي ، بينما كانت لمجموعة السيطرة 9.10% . وبالتالي يمكن الاستفادة من قيم هذه الاختبارات كمؤشرات لدور المستضدات الطفيلية في حث الاستجابة المناعية وانطلاق فكرة تحضير اللقاح .

قائمـــــــــــــة المحتويـــــــــات

ت	الموضوع	ص
	الخلاصة (باللغة العربية)	أ
	المحتويات	د
	قائمة الجداول	ح
	قائمة الأشكال	ي
	قائمة الصور	ك
	الفصل الأول	
	المقـــــدمـــــــــة	1
	الفصل الثاني	
	استعـــراض المراجـــع	
1-2	طفيلي اللشمانيا Leishmania Parasite	4
2-2	شكل الطفيلي Morphology of parasite	4
3-2	تصنيف اللشمانيا Leishmania taxonomy	5
4-2	دورة الحياة Life cycle	6
5-2	جنس اللِّشْمانِيَّا Genus: *Leishmania*	8
6-2	امراضية داء اللشمانيا Pathogenesis of Leishmaniasis	9
-1	انزيمات الفوسفاتيز الحامضية Acid Phosphatase Enzymes (APE)	10
-2	انزيم Protease	10
-3	Lipophosphoglycan coat (Lpg)	11
7-2	وبائية داء اللشمانيا Epidemiology of Leishmaniasis	11
8-2	تشخيص المرض diagnosis of Leishmaniasis	15
1-8-2	التشخيص المجهري المباشر	15
2-8-2	الزرع The culture	16
9-2	جينوم اللشمانيا Leishmania Genome	16

1-9-2	الجينوم النووي Nuclear Genome	16
2-9-2	جينوم منشأ الحركة Kinetoplast DNA	18
10-2	اختبارات التشخيص باستعمال تقنية ال PCR ذات الحساسية والنوعية العالية	19
11-2	الدراسات المناعية	22
12-2	الاستجابة المناعية لعدوى اللِّشْمانِيَّا Immune Response to *Leishmania* Infection	23
1-12-2	الاستجابة المناعية الخلوية Cellular immune Response	23
a	الخلايا اللمفاوية التائية المساعدة (CD_4) T-Helper	23
b	الخلايا اللمفاوية التائية القاتلة (CD_8) والخلايا القاتلة الطبيعية (NK)	24
c	الخلايا المقدمة للمستضد Antigen Presenting Cells	25
2-12-2	الاستجابة المناعية الخطية Humoral lmmune Response	26
13-2	عملية البلعمة في داء اللشمانيا Phagocytosis in Leishmania	27
14-2	السيطرة على داء اللشمانيا Control of *Lieshmaniasis*	28
1-14-2	اللقاحات Vaccination	28
15-2	التمنيع والتلقيح ضد داء اللشمانيا Immunization & Vaccination against Leishmaniasis	29
1-15-2	انواع اللقاحات ضد داء اللشمانيا Types of Vaccines against Leishmaniasis	29
2-15-2	العوامل المؤثرة على انتاج اللقاحات ضد داء اللشمانيا	34
3-15-2	المعايير المستخدمة في تحديد فعالية اللقاح	36
16-2	اللقاحات ضد داء اللشمانيا في العراق	36
	الفصل الثالث	
	المـــواد وطرائق العمـــل	
1-3	المواد	37
1-1-3	الاجهزة المختبرية المستخدمة	37

2-1-3	المواد الكيميائية Chemical materials	39
2-3	طرائق العمل Methods	40
1-2-3	جمع العينات من المرضى المصابين	40
3-3	الأوساط الزرعية والمحاليل المستخدمة Media & Solutions	41
1-3-3	الوسط ثنائي الطور Biphasic Medium	41
2-3-3	الوسط الزرعي الهلامي Semi-Solid Medium	43
3-3-3	تحضير الوسط الزرعي RPM I 1640 (Roswell park medium institute)	45
4-3	عزل طفيليات اللشمانيا	46
5-3	الصبغ Staining	46
6-3	طريقة الصبغ Method of staining	47
7-3	الدراسة الجزئية Molecular Study	47
1-7-3	استخلاص الـ DNA	47
2-7-3	ترحيل الـــ DNA Agarose Gel Electrophoresis	49
3-7-3	التوصيف الجزيئي للجينات المدروسة	50
4-7-3	تفاعل أنزيم البلمره المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR)	51
5-7-3	البرنامج المستخدم في الدراسة الجزئية	51
6-7-3	تحميل ناتج تفاعل البلمرة المتسلسل والترحيل الكهربائي	52
8-3	الدراسة المناعية للمرضى المصابين في محافظة كربلاء المقدسة	52
9-3	تحضير لقاح الببتيدات المجزأة *Lipophosphoglycan* (LPG) لطفيلي اللشمانيا	54
1-9-3	تهيئة الحيوانات المختبرية	54
2-9-3	الاختبارات المناعية :	55
1-2-9-3	اختبار فرط الحساسية المتأخر Delayed Type of Hypersensitivity (DTH)	55

2-2-9-3	البلعمة Phagocytosis Index	56
3-2-9-3	فحص التحول اللمفاوي Lymphocyte transformation assay	57
a-3-2-9-3	المحاليل والمواد المستخدمة	57
b-3-2-9-3	طريقة العمل	58
10-3	التحليل الاحصائي	59

ت	الفصل الرابع	ص
	النتـــــائج	
1-4	عزل اللشمانيا الجدلية CL من القرح الجلدية في المصابين	60
2-4	توزيع الاصابة بداء اللشمانيّا الجلدية بين المصابين استنادا الى العمر والجنس	61
3-4	توزيع الاصابة باللشمانيا الجلدية استنادا الى طبيعة السكن والجنس	62
4-4	توزيع الاصابة باللشمانيا الجلدية نسبة الى عدد قرح الإصابة	63
5-4	توزيع الخمج بداء اللشمانيا الجلدية للوافدين طبقا الى مناطق الجسم	63
6-4	توزيع اللشمانيا الجلدية استنادا الى نوع القرحة	64
7-4	الدراسة الجزيئية وتشخيص انواع اللشمانيا الجلدية بواسطة تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي	66
8-4	التشخيص بتقنية الـ PCR للشمانيا الجلدية بالمقارنة مع الجنس والفئات العمرية	68
9-4	اللشمانيا الجلدية في محافظة كربلاء المقدسة	70
10-4	انواع الطفيليات المسببة للشمانيا الجلدية في محافظة كربلاء	73
11-4	الدراسة المناعية للمرضى المصابين بداء اللشمانيا الجلدية في محافظة كربلاء	75
1-11-4	مستويات الغلوبيولينات المناعية الكلية IgG وIgM لدى المصابين بطفيلي اللشمانيا الجلدية الكبرى (*L. major*) بتقنية الاليزا (ELISA)	75
2-11-4	مستويات الغلوبيولينات المناعية الكلية IgG وIgM لدى المصابين بطفيلي اللشمانيا الجلدية المدارية (*L-tropica*) بتقنية الاليزا (ELISA)	76
3-11-4	مستويات الحركيات الخلوية لدى المصابين بطفيلي اللشمانيا الجلدية الكبرى (*L. major*)	78

4-11-4	مستويات الحركيات الخلوية لدى المصابين بطفيلي اللشمانيا الجلدية المدارية - (L.tropica)	80
12-4	دراسة تأثير لقاح المستضد اللشماني المنقى - Lipophasphoglycan (LPG) في الحيوانات المختبرية	81
13-4	تقييم سلامة لقاح مستضد اللشمانيا المنقى Lipophasphoglyca (LPG)	84
ت	**الفصل الخامس**	**ص**
	المناقشـــــة	
1-5	دراسة لأنواع اللشمانيا الجلدية ومميزاتها في بعض محافظات القطر	85
2-5	دراسة داء اللشمانيا الجلدية في محافظة كربلاء المقدسة	91
3-5	الدراسة المناعية للمرضى المصابين بداء اللشمانيا الجلدية في محافظة كربلاء المقدسة. مستويات الكلوبيولينات المناعية الكلية IgG و IgM لدى المصابين بطفيلي اللشمانيا الجلدية بتقنية الاليزا(ELISA)	91
4-5	مستويات السايتوكينات - Cytokine levels	92
5-5	تأثير لقاح المستضد اللشماني المنقى (Lipophasphoglycan (LPG في الحيوانات المختبرية	94
	الاســـــتنتاجات والتوصـــــــيات	
	الاستنتاجات	96
	التوصيات	97
	المصـــــــــــــــــــــادر	
	المصادر العربية	98
	المصادر الأجنبية	99

ت	**قائـــمة الجـــداول**	**ص**
1-2	يبين اهم انواع طفيلي اللشمانيا والمضائف الناقلة والخازنة لها والامراض المتسببة عن الاصابة بها	9
2-2	يبين بعض لقاحات الجيل الثاني ضد داء اللشمانيا	34
1-3	يوضح الأجهزة والمستلزمات المختبرية المستخدمة في الدراسة	37

2-3	يوضح المواد الكيميائية المستخدمة في الدراسة	39
3-3	مكونات الوسط ثنائي الطور NNN Medium الطور الصلب Solid Phase في اللتر الواحد	42
4-3	مكونات الوسط ثنائي الطور – الطور السائل Liquid Phase في اللتر الواحد	43
5-3	مكونات الوسط الزرعي شبه الصلب Semi – Solid Medium في اللتر الواحد	44
6-3	المواد المستخدمة في تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل	51
7-3	البرنامج المستخدم في الدراسة الجزيئية	52
1-4	اعداد حالات الاصابة بداء اللشمانيا الجلدية CL في بعض المحافظات العراقية	60
2-4	توزيع الاصابة بداء اللشمانيّا الجلدية بين المصابين استنادا الى العمر والجنس	61
3-4	يوضح توزيع الاصابة استنادا الى طبيعة السكن والجنس	62
4-4	توزيع الاصابة باللشمانيا الجلدية نسبة الى عدد قرح الاصابة	63
5-4	يوضح توزيع الاصابة بالنسبة لموقعها على مناطق الجسم	64
6-4	يبين اعداد المصابين من الذكور والاناث استنادا الى نوع القرحة	65
7-4	يبين التشخيص الجزيئي لطفيلي اللشمانيا الجلدية في محافظات القطر موضحا نوع العترة في كل محافظة	68
8-4	توزيع الانواع الاصابات الجلدية المشخصة في تقنية PCR تبعا للجنس والفئات العمرية	69
a-9-4	توزيع المرضى المصابين بداء اللشمانيّا الجلدية حسب مناطق السكن في محافظة كربلاء لعام (2010-2011)	70
b-9-4	) توزيع اللشمانيا الجلدية في محافظة كربلاء استنادا الى اشهر السنة تشرين الأول 2010الى أيلول 2011	71
c-9-4	توزيع المرضى المصابين بداء اللشمانيّا الجلدية حسب مناطق السكن في محافظة كربلاء لعام (2011-2012)	72
d-9-4	توزيع اللشمانيا الجلدية في محافظة كربلاء استنادا الى اشهر السنة تشرين الأول 2011الى أيلول 2012	73

10-4	توزيع اللشمانيا الجلدية في محافظة كربلاء استنادا الى نوع الطفيلي	74
a-1-11-4	معدل التراكيز SE ± (ملغم / د.لتر) للاميونوكلوبيولين IgG و IgM في امصال (94) مريض مصاب باللشمانيا الجلدية الكبرى (*L. major*) والاشخاص الاصحاء	76
b-1-11-4	معدل التراكيز SE ± (ملغم / د.لتر) للاميونوكلوبيولين IgG و IgM في امصال (94) مريض مصاب باللشمانيا الجلدية الكبرى (*L. major*) والاشخاص الاصحاء عند المعاملة وفي فترة العلاج .	76
a-2-11-4	) يوضح معدل التراكيز SE ± (ملغم / د.لتر) للاميونوكلوبيولين IgG و IgM في امصال (31) مريض مصاب باللشمانيا الجلدية المدارية (*L.tropica*) والاشخاص الاصحاء	77
b-2-11-4	يوضح معدل التراكيز SE ± (ملغم / د.لتر) للاميونوكلوبيولين IgG و IgM في امصال (31) مريض مصاب باللشمانيا الجلدية المدارية (*L.tropica*) والاشخاص الاصحاء عند المعاملة وفي فترة العلاج	78
a-3-11-4	معدل تراكيز السايتوكينات SE ± لـ (94) مريض مصاب باللشمانيا الجلدية الكبرى (*L. major*) ومجموعة السيطرة الاصحاء.	79
b-3-11-4	يوضح مستويات المصل بالملغم /د. لتر لكل من IFN- γ و IL-10 لـ (94) مصاب باللشمانيا الجلدية الكبرى مقاس بتقنية الاليزا قبل وخلال وبعد العلاج	79
a-4-11-4	معدل تراكيز السايتوكينات SE ± لـ (31) مريض مصاب باللشمانيا الجلدية المدارية (*L. tropica*) ومجموعة السيطرة الاصحاء	80
b-4-11-4	يوضح مستويات IFN- γ و IL-10 لـ (31) مصاب باللشمانيا الجلدية المدارية مقاس بتقنية الاليزا قبل وخلال وبعد العلاج	81
a-12-4	يمثل معدلات نسب الخلايا اللمفاوية المتحولة في مجموعات الفئران المحقنة بتركيز لقاح مستضد اللشمانيا (LPG) ومجموعة السيطرة بعد (15) يوم من الحقن	82
b-12-4	يمثل نتائج اختبار فرط الحساسية المتأخر في مجموعات الفئران المحقنة بتركيز لقاح مستضد اللشمانيا (LPG) ومجموعة السيطرة بعد مرور (15) من الحقن	83
c-12-4	يمثل معدلات نسب الخلايا الملتهمة في مجموعات الفئران المحقنة بتركيز لقاح مستضد اللشمانيا (LPG) ومجموعة السيطرة بعد مرور (15) من الحقن	83

ت	قـــــــائمة الإشكـــــال	ص
1-2	شكل ودورة حياة اللشمانيا الاستوائية *L. tropica*	7
2-2	توزيع الاصابة باللشمانيا الجلدية على محافظات العراق لعام 2007	15
3-2	يمثل دورة كاملة في جهاز الـ PCR يتضاعف في الحامض النووي الى شريطين	22
1-3	استمارة استبيان خاصة بالمصابين بمرض اللشمانيا الجلدية	41

ت	قـــــــائمة االصور	ص
1-4	تبين طفلة عمر 3 سنوات من محافظة واسط مصابة بحبة بغداد في موقعين الوجه والاطراف السفلى	65
2-4	توضح وجود الدنا DNA المستخلص من طفيلي اللشمانيا الجلدية من خلال ترحيله في الاكاروز	66
3-4	الترحيل الكهربائي لنتائج تنميط عزلات من (*Leismania major*) pb560 بواسطة تقنية الـ PCR	67
4-4	الترحيل الكهربائي لنتائج تنميط 7 عزلات من (*Leismania tropica*) 750 pb بواسطة تقنية الـ PCR	67

قائمــــــــة المختصـــــــرات
List of Abbreviations

ACL	anthroponotic cutaneous leishmaniasis
AIDS	Aquired Immunodeficiency Syndrome
APC	Antigen Presenting Cells
APE	Acid Phosphatase Enzymes
BCG	Bacillus of Calmtte and Guerin
CD	(markers) Cluster of differentiation
CL	Cutaneous Leishmania
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTPs	Deoxynuleoside triphosphates
DTH	Delayed Type Hypersensitivity
ELISA	Enzyme linked Immuno-sorbent Assay
ECi	Enzyme Catalyze
Gp	Glycoprotein
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IFN-γ	Interferon-gamma
IL-	Interleukin
kDNA	Kinetoplast DNA
L	*Leishmania*
LD	*Leishmania donovani*
Lpg	Lipophosphoglycan
LST	Leishmanin Skin Test
LST	Leishmanin Skin Test
NK	Natural Killer cell
NNN	Biophasic Mediam(Novy, MacNeal-Nicolle)
PBS	Phosphate Buffer Saline
PHA	Phytohaemagglutinin
RPM I -1640	Roswell park medium institute
Th_1	T-Helper-1
Th_2	T-Helper-2
VL	Visceral leishmania
WHO	World health organization
ZCL	zoonotic cutaneous leishmaniasis

المقدمة

داء اللشمانيا Leishmaniasis مرض طفيلي يتسبب عن ابتدائيات طفيلية وهو سائد في مناطق كثيرة من العالم (Ovendale *et al*., 1998) اذ يسود في اربع قارات ويعد من قبل منظمة الصحة العالمية (WHO) واحدا من أكبر ستة أمراض طفيلية تصيب الإنسان (WHO,2010) .

ان هناك انماطاً متعددة من هذا المرض لكل منها مظاهر سريرية مختلفة : النمط الجلدي Cutaneous والنمط الجلدي المنتشر Diffuse Cutaneous والنمط الجلدي المخاطي Mucocutaneous والنمط الاحشائي Visceral (Marquardt *et al*.,2000) .

يعرف داء اللشمانيا الجلدي CL ايضا بالحبة الشرقية Oriental Sore وهو مرض خطير على الصحة العامة وله مجموعة واسعة من الأعراض السريرية كونه منتشر في أكثر 88 بلد ، بما في ذلك إيران اذ تعد واحدة من البؤر الموبوءة من CL (Mahmoodi *et al* ., 2010 ; Nadim and Azizi ,2000) . يعيش طفيلي اللشمانيا داخل الخلايا البلعمية (Macrophage) للمضيف الفقري بالشكل اللاسوطي (Amastigote) ، وفي معي حشرة ذبابة الرمل *Phlebotomus* sp. (Sandfly) بالشكل أمامي السوط (Promastigote) (Lainson and Shaw, 1987; Peters and Killick ,1987) .

ينتقل داء اللشمانيّا Leishmaniasis عن طريق لدغة انثى ذبابة الرمل المصابة بطفيليات اللشمانيا، اذ يصاب نحو 30 نوعاً من حشرة ذبابة الرمل عندما تاخذ وجبتها من الدم من المضائف المصابة بالطفيليات كالانسان او المضائف الخازنة مثل الحيوانات البرية كالقوارض والحيوانات الاليفة مثل الكلاب والماعز والجمال والقطط ايضا (Alexander *et al*., 1995) .

ان شكل اللشمانيا الجلدية يتدرج من شكل بسيط إلى معقد وان تحديد المواصفات له مهم جدا في تحديد استراتيجيات السيطرة والوقاية والعلاج . و تشابه اعراض مرض اللشمانيا الجلدي تلك التي تظهر في العديد من الأمراض الجلدية الأخرى ، ومن ثم فإن تأكيد نوع الطفيلي يكون ضروري عند الاشتباه في التشخيص (Azizi *et al*., 2011 ; Asgari *et al* ., 2007) .

ان تشخيص الـ CL في العيادات الطبية تعتمد على ظهور الطفيلي في مسحات أو عينات خزعة الجلد عن طريق الفحص المجهري المباشر والفحص المناعي ، وان هذه الأساليب الكلاسيكية تفتقر الى الحساسية العالية والخصوصية وعدم تقديم أي أدلة بشأن الأنواع المعنية في التسبب بالمرض لذلك يتم تطبيق سلسلة تفاعل البلمرة Polymerase Chain Reaction

(PCR) بنجاح في السنوات الأخيرة للكشف عن انواع اللشمانيا (Laskay *et al* ., 1995; Sreenivas *et al* ., 2002) ، حيث ومع التطور في مجال التكنولوجيا الحيوية والذي يقوم على التعامل مع الحامض النووي (DNA) بشكل أساسي ، اهتم العلماء على أن يبحثوا عن طريقة أو تقنية تقوم على مضاعفة كمية الحامض النووي (DNA) بشكل كبير ، وهي تقنية مختبرية تقوم على إكثار نسخ الحامض النووي (DNA) خارج النظام الحيوي . أي أنها طريقة لنسخ الحامض النووي في المختبر . ولذلك فهي تقنية حيوية لاستنساخ قطعة محددة من الحامض النووي و مضاعفة إنتاجها لكي يتسنى إجراء الاختبارات الجزيئية ومعرفة الجينات (Moemenbelah- Fard *et al* ., 2003; Davami *et al*., 2011; Ghasemian *et al* .,2011) .

نظرا لتنوع طفيليات اللشمانيا وتنوع مضائفها الناقلة والخازنة والتي تقود الى ملامح وبائية مختلفة يتوجب ايجاد طريقة شاملة ممكنة التطبيق للسيطرة على داء اللشمانيا ، ومن اهم هذه الطرق في الوقت الحاضر هي السيطرة على المرض بواسطة التمنيع باللقاحات (Modabber , 2000) .

ان منظمة الصحة العالمية اعطت اولوية كبيرة للبحوث المتعلقة باللقاح ضد داء اللشمانيا اذ اصبح واحدا من اهم اهداف هذه المنظمة انتاج لقاح فعَال وسهل التحضير وذي كلفة قليلة ، وتجدر الاشارة الى ان الكثير من التجارب على الحيوانات المختبرية تتم الان في بعض الدول التي اصبحت بحاجة الى هذا اللقاح ، وان هذا الاهتمام الكبير بانتاج اللقاحات ضد داء اللشمانيا اعطى نتائج جيدة في بعض دول العالم وخاصة فنزويلا ، البرازيل وايران ، وفي العراق قام بعض الباحثين بدراسة امكانية انتاج لقاحات ضد انواع اللشمانيا المنتشرة في القطر (التميمي ، 1990 ؛ المرسومي ،1995 ؛ الورد ،2001 ؛ النجار ، 2002) .

ان اللقاح الفعال ضد بعض انواع اللشمانيا يمكن ان يتوفر خلال السنوات القليلة القادمة (Mohammad *et al* ., 2014) , اذ ان هناك عدة اسباب جعلت عملية انتاج اللقاح ضد اللشمانيا الجلدي ممكنة كنموذج ضد معظم اشكال المرض ومن ضمن هذه الاسباب : 1- الاستجابة المناعية طويلة الامد التي تلي الشفاء من المرض (Yamakami *et al*., 2005) . وهذا لا يعني ان المناعة مطلقة ، لان تكرار الخمج باللشمانيا الجلدية سجل بعد شفاء القرحة الاولى . 2- يمكن تحفيز الجهاز المناعي لمقاومة تكرار الخمج في الحيوانات المختبرية 3- سهولة تنمية الطفيلي في اوساط عدة وبالتالي سهولة التعامل معه (Schuster and Sullivan, 2002) 4- الطبيعة غير

الخبيثة لداء اللشمانيا الجلدي المتسبب عن اللشمانيا الجلدية *L. tropica* (Modabber, 1990)

.

ونظرا للانتشار الواسع لهذا النوع من الطفيليات في الآونة الاخيرة وقلة الدراسات الجزيئية المشخصة لهذا الطفيلي في محافظات الفرات الاوسط والجنوب فضلا عن الدراسات المناعية ، هدفت هذه الدراسة الى تحقيق المحاور التالية :

1- دراسة انواع الطفيليات التي تسبب الداء الجلدي CL في محافظات الفرات الاوسط والجنوب والتي لديها أهمية هائلة في الوبائية . ويتم التعرف عليها من خلال الطرق الروتينية فضلا عن التشخيص الجزيئي بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل(PCR) بتحديد الجين المستخدم في تشخيص الطفيلي .

2- دراسة لبعض الاوجه المناعية للمرضى المصابين في محافظة كربلاء .

3- امكانية تحضير لقاح مستضدات اللشمانيا الجلدية .

الفصل الثاني

استعراض المراجع

2-1 طفيلي اللشمانيا *Leishmania* Parasite

طفيلي اللشمانيا كائن ابتدائي parasitic protozoa ذو اهمية طبية ويعد من الكائنات حقيقية النواة Eukaryotic وحيدة الخلية تعيش منفردة او بشكل مجاميع او مستعمرات ولها القدرة على القيام بالفعاليات الايضية والوظائف البايولوجية المختلفة . وغالباً ما تكون ذات انوية واضحة ومعظم هذه الكائنات تكون حرة المعيشة ولكن قسماً منها لا يمكنه العيش الا داخل المضيف اي بصورة متطفلة Obligate intracellular parasite كما في حالة طفيلي اللشمانيا . حيث يعيش ويتكاثر داخل البلاعم Macrophages للمضيف الفقري (السعدي وطاهر، 1990) .

هناك اختلافات واضحة بين أنواع اللشمانيا *Leishmania* spp. لا يمكن تمييزها اعتمادا على مظهرها أو شكلها، اذ يعتمد التنوع على عوامل عدة منها سلوك الطفيلي في الإنسان واختلاف التوزيع الجغرافي واختلاف توطن المرض ومناطق وجوده ، فضلا عن نوع الحيوان الخازن للطفيلي الخاص بكل نوع وانتقاله بأنواع مختلفة من ذبابة الرمل (Rassam & Al-Mudhaffar, 1997) كما أن تطور ونمو طفيلي اللشمانيا في ذبابة الرمل الناقلة للمرض يؤدي دورا كبيرا في تصنيف الطفيلي (Johnson and Hertig ,1990) ، ويعتمد تصنيف طفيليات اللشمانيا حاليا على التحليل الكيميائي الحياتي لدراسة ترتيب أنماط نظير الأنزيم التي تحتويها Isoenzyme Patterns واستعمال دراسة كثافة الحوامض النووية DNA والانتشار المناعي في الجيلاتين ، كما عزلت الكروموسومات لأنواع مختلفة من اللشمانيا *Leishmania* spp. (Al-Barwarie *et al.*, 1985; Mandell *et al.*, 1995) .

2-2 شكل الطفيلي Morphology of parasite

جنس اللشمانيا ثنائي المضيف له طور مغزلي أمامي السوط Promastigote يعيش في المضيف اللافقري امعاء الحشرة الناقلة (ذبابة الرمل) العائدة للجنس *Phlebotomus* والجنس *Lutzomyia* وفي الاوساط الزرعية المصنعة ، ويكون مغزليا متحركاً يبلغ طوله 15- 20 مايكرومتراً وعرضه 1.5- 3.5 مايكرومتر ويحتوي على مولد الحركة kinetoplast يقع على بعد 2 مايكروميتر من النهاية الامامية ويمتد منه سوط يصل طوله بمقدار طول جسم الطفيلي حيث يبلغ 15-28 مايكروميتر ، يحتوي على نواة واضحة تقع في الجهة الخلفية وعلى جسم نووي مركزي (Ritting and Bogdan,2000).

وطور دائري او بيضوي عديم السوط Amastigote صغير، ويبلغ طوله 3-5 مايكرومتر، اما عرضه فيتراوح مـــا بين 1-3 مايكرومتر غــير متحرك يتكاثر داخل بلاعم المضيف الفقري (Reguera *et al*., 1998) . وفي كلا الشكلين يتم التكاثر بوساطة الانشطار الطولي Longitudinal fission ويتميز السايتوبلازم بشكل واضح عن النواة ويحتوي على المايتوكوندريا وفجوات وحبيبات قاعدية (Myles *et al*., 2007) .

3-2 تصنيف اللشمانيا *Leishmania* taxonomy

يعود طفيلي اللشمانيا الى رتبة Kinetoplastida بسبب امتلاكه الجسيم الحركي Kinetoplast والمايتوكوندريا وبقية العضيات السايتوبلازمية التي تعود إلى هذه الرتبة والتصنيف الكامل ، للطفيلي حسب (Berman, 1988) هو :

Kingdom: Protista

Subkingdom: Protozoa

Phylum: Sarcomastigophora

Subphylum: Mastigophora

Class: Zoomastigophora

Order: Kinetoplastida

Suborder: Trypanosomatina

Family: Trypanosomatidae

Genus: *Leishmania*

وقد اشار Chan-Bacad and Pena-Rodriguez, (2001) الى تمييز الانواع التابعة لجنس اللشمانيا بواسطة الطرق والدراسات الجينية والمناعية والكيميوحياتية .

4-2 دورة الحياة Life cycle

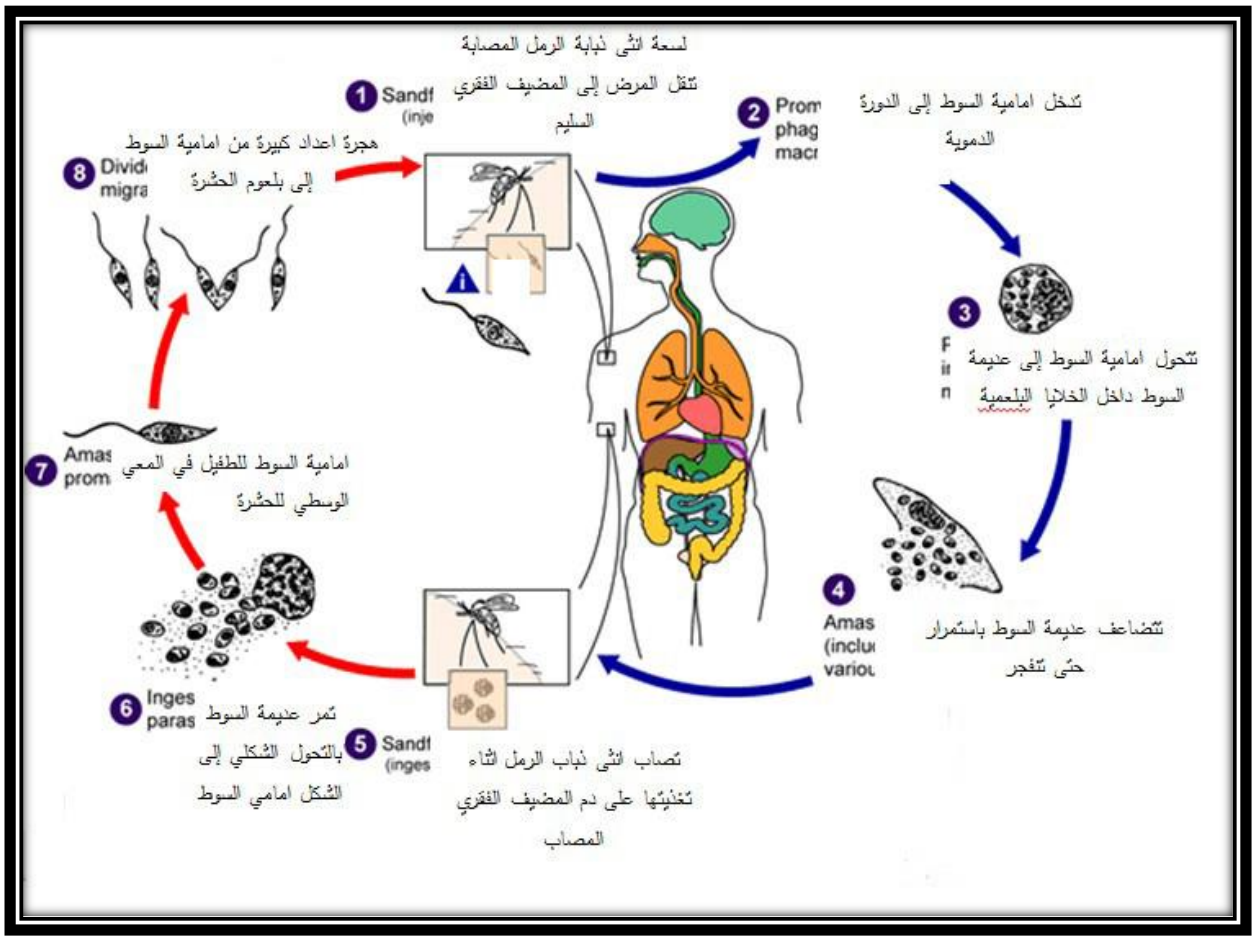
يعد مرض اللشمانيا من ضمن الامراض الطفيلية الحيوانية المصدر، يصاب بها الانسان عن طريق لدغ انثى ذبابة الرمل، وهذه الحشرة صغيرة الحجم، وليس لها صوت عند طيرانها اثناء المساء، على ارتفاع منخفض من سطح الارض، وتعيش في الجو الحار الرطب، لذلك فان نشاطها يزداد في فصل الصيف، وتتغذى على دم الانسان او الحيوان (Rebollar *et al*.,2005) .

وعندما تمتص دم انسان او حيوان مصاب مثل (الكلاب او الثعالب) فان اول خطوة تحدث هي تحول الطور العديم السوط الى الطور امامي السوط ، الذي يتكاثر في معدة الحشرة ثم يصل الى الجزء الامامي من الامعاء الوسطى ليستقر في لعابها، وعند لدغها انساناً او حيواناً سليماً فانها تحقن هذه الطفيليات في جسمه مسببة له المرض (Salomon *et al*., 2007 ; Motazedian *et al* .,2006) .

وعندما تبتلع الخلايا البلعمية الطفيلي في الحيوان الفقري نتيجة لتجمعها بفعل التلف الحاصل في الانسجة جراء لدغة الحشرة وفيها يتحول الى الطور عديم السوط خلال مدة قصيرة 12-24 ساعة ، ويستمر بالانقسام داخل البلاعم وعندما تمتلئ الخلية البلعمية بالطفيلي فانها تنفجر وتتحرر الاطوار عديمة السوط لتصيب غيرها من الخلايا البلعمية وعندما تقوم الحشرة الناقلة بتناول وجبة دم من المضيف المصاب فانها تقوم باخذ الطور عديم السوط في الدم المحيطي وهكذا تعيد دورة الحياة من جديد (شكل 2-1) (Killick – Kendrick, 1990) .

ان ذبابة الرمل تنقل طفيليات مرض اللشمانيا اما من شخص الى اخر او من حيوان الى اخر ، وهناك نوع من اللشمانيا يسمى (الكلازار الهندية) ، قد ينتقل من انسان الى انسان، واثبتت الدراسات الحديثة التي اجراها Sundar *et al*., (2010) عن حدوث المرض نتيجة نقل الدم من اشخاص حاملين لهذا المرض.

ويمكن تقسيم المرض من الى ثلاثة انواع متميزة: اللشمانيا الحشوية ، اللشمانيا الجلدية ولشمانيا الاغشية المخاطية .



الشكل (2-1) : شكل ودورة حياة اللشمانيا الاستوائية *L. tropica* (WHO, 2000)

5-2 جنس اللشمانيا Genus: *Leishmania*

ان اهم أنواع طفيليات اللشمانيا في العالم القديم والحديث، هي:

Old World

Leishmania donovani

Leishmania tropica

Leishmania infantum

Leishmania major

Leishmania aethiopica

New World

Leishmania chagasi

Leishmania enriettii

Leishmania amazonensis

Leishmania venzuelensis

Leishmania braziliensis

يحتوى جنس اللشمانيا على ثلاث أنواع تصيب الإنسان هي اللشمانيا المدارية (*L.tropica*) وهى التي تسبب مرض اللشمانيا الجلدية (حبة بغداد) واللشمانيا البرازيلية (*L.braziliensis*) والتي تسبب مرض اللشمانيا المخاطي الجلدي (داء اللشمانيا الأمريكية) و لشمانيا دونوفانى (*L.donovani*) والتي تسبب داء اللشمانيا الحشوى (Kala-azar) (Pearson *et al*., 2000) جدول (2-1) .

جدول (2-1) يبين اهم انواع طفيلي اللشمانيا والمضائف الناقلة والخازنة لها والامراض المتسببة عن الاصابة بها (Handman , 2001)

الطفيلي	المضيف الخازن	الناقل الاساسي	مظاهر المرض
Leishmania donovani	الكلاب ، قوراض السهول ، الانسان	*P.argentipes* *L.longipalpis*	1- داء اللشمانيا الاحشائي 2- داء اللشمانيا الجلدي بعد الاحشائي
Leishmania tropica	الانسان	*P.sergenti*	1- داء اللشمانيا الجلدي (البثرة الشرقية الجافة المدينية) 2- داء اللشمانيا الاحشائي
Leishmania major	قوارض السهول و قوارض الصحاري ، Rhombomys, Psammomys, Arvicanthis قوارض	*P.papatasi* *P.longipes*	1- داء اللشمانيا الجلدي (البثرة الشرقية الرطبة الريفية) 2- داء اللشمانيا الجلدي داء اللشمانيا الجلدية المنتشر ، داء اللشمانيا الجلدي
Leishmania mexicana Complex	قوارض الغابات	*L.flaviscutellata* *L.olmeca*	داء اللشمانيا الجلدي المنتشر
Leishmania braziliensis Complex	الكلاب	*L.umbratilis*	داء اللشمانيا الجلدي، داء اللشمانيا الجلدي المخاطي

6-2 امراضية داء اللشمانيا Pathogenesis of Leishmaniasis

داء اللشمانيا (CL) واحد من العوامل المسببة للأمراض حيوانية المنشأ الهامة في الانسان والتي يمكن أن تسبب التهابات خطيرة وتهدد الحياة ، وكذلك الحال مع المضائف العرضية وغيرها من الحيوانات (وخاصة القوارض والكلاب) وكما هو الحال في معظم الامراض الطفيلية فان مواجهة الإنسان

لهذه الإمراض يعتمد على التفاعلات المعقدة بين الاستجابات المناعية للمضيف وعوامل الفوعة من أنواع اللشمانيا (Ridley,2004) . وان من اهم عوامل الضراوة في اللشمانيا هي :

1- انزيمات الفوسفاتيز الحامضية Acid Phosphatase Enzymes (APE)

الفوسفاتيز الحامضي من الانزيمات المحللة الهامة في اللشمانيا الجلدية ، وهي معروفة باسم (EC3.1.3.2) التي تتواجد في العديد من انواع الكائنات الحية الدقيقة (CDC , 2009) . ان مصدر هذه الانزيمات هو جهاز كولجي ، وقد تتواجد في الشبكة الإندوبلازمية ، المستلمات السوطية وعلى اسطح الاغشية الخارجية (Doyle and Dwyer,2005) .

وجد كل من Shakarian and Dwyer (2008) بان الـ APE يلعب دور مهم في وقف انتاج منتجات المؤكسدات O2, H2O2 من قبل الخلايا البلعمية ، ايضا له وظائف عملية مهمة في حركة ووظيفة الطفيلي وحماية الطفيلي تحت الظروف البيئية غير الملائمة ، ان الضراوة في الطور Amastigots للـ APE تكون اكثر بمرتين مما هو في طور Promastigot . وهناك نوع اخر من الـ APE يسمى خارج خلوي (Extracellular APE) ولكن عمله غير واضح (Soares *et al*., 2008) .

2- **انزيم Protease**

يوجد هذا الانزيم في الطور غير المسوط Amastigots في تركيب يسمى megasomes ونشاط هذه الإنزيم يرتبط مع البروتين سكري رئيسي في السطح (KD-Gp63) ،الـ metalloprotease المعتمدة على وجود الزنك و lipophosphoglycan ، لكلا الطورين Promastigot الخارج خلوي و Amastigotsالداخل خلوي (Bates and Rogers,2007) . الـ Protease مهم جدا في ضراوة داء اللشمانيا عند الحامضية المثلىPH (ويسمى أيضا الانزيم الممرض للشمانيا او انزيم الحماية) اذا أن وظائفه حماية الطفيلي فعندما تبتلعه خلية البلعم الكبير macrophage بنجاح ، يحدث ان الأمونيا NH4 واليوريا تغيران الحامضية PH للاجسام الحالة phagolysosomes ولبروتينات التحلل hydrolyze lysosomal protein (Ferreira *et al*.,2009) ، من جهة فانه مهم في ربط طفيلي اللشمانيا مع مستقبلات المتمم للبالعات CR1 وCR3 (Huber *et al*.,1998) .ان طور Amastigots ذو فعالية عالية للـ Protease مما في طورPromastigot لذلك يعزى دور الضراوة في الكائن (Klein, 2004; Chaudhuri and Chang,1988) .

3- المركب لايبو فوسفو كليكان Lipophosphoglycan coat (Lpg)

تمتلك انواع اللشمانيا المركب Lipophosphoglycan الذي يغطي كل السطح الخارجي لخلية اللشمانيا ، والـ Lpg يستحث اتصال المستقبلات مثلا المستقبل-2 ، ومستقبل الاشارة هذا يشترك في حث الاستجابة المناعية الطبيعية في اللبائن (Robert *et al.*,2011) .

يختلف التركيب الدقيق للـ Lpg باختلاف الأنواع والمرحلة في دورة حياة الطفيلي ، فالمركب glycan متغير بشكل خاص و التنوعات المختلفة للـ Lpg يمكن استخدامها كدليل لاختلاف الطور او المرحلة في دورة الحياة .(Gerald *et al.*,2000) .

يستخدم Lpg من قبل الطفيلي لتعزيز بقائه في المضيف و كذلك تعزيز الآليات التي من خلالها يقوم الطفيلي بتحوير الاستجابة المناعية للمضيف ، حيث تستطيع طفيليات اللشمانيا ان تعيش داخل macrophages وتحتاج لمنع الخلية البلعمية من قتلها . يكون لل Lpg دور في مقاومة نظام المتمم ، تثبيط بدأ الاستجابة التأكسدية ، وكذلك الاستجابة الالتهابية و منع الخلايا التائية القاتلة الطبيعية من تمييز البلاعم المصابة باللشمانيا .(Wolday *et al.*,2004) .

2-7 وبائية داء اللشمانيا Epidemiology of Leishmaniasis

داء اللشمانيا الجلدي هو نوع واحد من انواع الاصابة بداء اللشمانيا وهناك نوعين من المصطلحات التي تستخدم في منظمة الصحة العالمية (WHO) لهذا الداء هما داء اللشمانيا الجلدي في العالم القديم (Old World) وداء اللشمانيا الجلدي في العالم الحديث (New World) (WHO,2011a) .

فترة الحضانة في مختلف انواع داء اللشمانيا تتراوح من عدة ايام الى عدة سنوات ولكن عادة ما تكون في حدود عدة أسابيع إلى 6 أشهر، في داء اللشمانيا الجلدي ، تظهر الآفات الجلدية الأولية عادة بعد عدة أسابيع من دخول الطفيلي واصابته للأوعية ، حيث فترة الحضانة بمعدل من 2-6 أشهر .(Faulde *et al.*,2008) ، وعلى اية حال في الكثير من المناطق الموبوءة تعتبر الكلاب مستودعا رئيسيا لإصابة الانسان بينما في مناطق أخرى يعتبر الانسان الخازن الرئيسي يساعد في زيادة انتشاره (Elamin *et al.*,2005) .

ان الانسان وبعض الحيوانات القريبة منه تعد من المضائف العرضية لكثير من انواع اللشمانيا *L* .spp والتي تحتفظ بدورات بين الحيوانات البرية وذباب الرمل *L. tropica* و *L. infantum* ، وبقية الانواع ممكن ان تحفظ في القطط ، الكلاب ، القوارض .. الخ تزيد من مخاطر الانتقال

الى الانسان ، الحيوانات السائدة الاخرى ممكن ان تشترك كمضائف ثانوية عند الاصابة بـ *L. donovani, L. major, L. mexicana, L. guyaensis, L. chagasi , L. tropica* and *L. peruviana* وتتكيف للانسان ، لكن احيانا ممكن ان تصاب الحيوانات (Kerr *et al*., 2008) . ان التغيرات التي طرأت على البيئة لها تأثير قوي على وبائيات داء اللشمانيا حيث اقترح بأن التوزيع وقوة المرض سوف تتأثر بتغير المناخ الناجم عن الاحتباس الحراري (Jourquera *et al*.,1998) .

ان ذباب الرمل من جنس *Phlebotomus* العالم القديم (Old World) و *Lutzomyia* العالم الجديد (New World) هي النواقل الرئيسة المسؤولة عن نقل المرض. حاليا هذه هي الناقلات المعروفة الوحيدة القادرة على الانتشار ، والبراغيث والقراد و لم تظهر المفصليات الأخرى كناقلات مختصة ، ومع ذلك، فقد تم رصد حالات نادرة من داء اللشمانيا من خلال تبادل الدم أو سوائل الجسم والمخالطة المباشرة و حالة واحدة على الأقل من الانتقال الجنيني و المحاقن بين متعاطي المخدرات عن طريق الحقن الوريدي . ان وبائيات داء اللشمانيا تعتمد على خصائص الأنواع الطفيلية ، والخصائص البيئية لمواقع الانتقال ، والتعرض السابق والحالي من مجتمع الانسان للطفيلي ، وعمر المضيف، التثبيط المناعي " التثبيط المناعي مثل البالغين المصابين بفيروس نقص المناعة البشرية HIV الذين يدخلون المنطقة الموبوءة في حظر لهذا المرض " ، الموسم ، ونوع وهيكل المبنى أو المنزل ، والتوزيع الجغرافي و التفاوت الواسع للسلوك البشري (De Lima *et al*.,2008) .

ووفقا لمنظمة الصحة العالمية WHO (2011c) فان المرض متوطن في 88 بلدا من شمال الأرجنتين إلى وسط وجنوب الولايات المتحدة الأمريكية ، جنوب أوروبا ، وآسيا (ماعدا جنوب شرق آسيا) ، والشرق الأوسط و أفريقيا (وبخاصة وسط وشمال أفريقيا ، مع حالات متفرقة في أماكن أخرى) ولكن ليس في أستراليا. أكثر من 90 ٪ من الحالات لجميع أنحاء العالم تحدث في بنغلاديش ، شمال شرق الهند (ولا سيما ولاية بيهار) ، والنيبال، و السودان (العالم القديم) و شمال شرق البرازيل (العالم الجديد) (Caceres *et al*.,2007) .

ان خمسة على الأقل من الأنواع تسبب داء اللشمانيا الجلدي في العالم القديم (*L. donovani , L. infantum, , L.tropica , L. aethiopica L. major*) و الانواع *L. major and , L.tropica* تتسبب في معظم الحالات ، *L. donovani* تسبب بعد المرض الحشوي الكالا – آزار kala-azar وداء اللشمانيا الجلدي . أيضا ان *L. tropica* تسبب المرض الحشوي بين الجنود الأمريكيين الذين يخدمون في شبه الجزيرة العربية (Shiraz and Syed,2007) .

ذكر Rosenthal *et al*., (2003) ان الحالات في جميع أنحاء العالم آخذة في الارتفاع . بسبب ظهور بؤر مستوطنة جديدة مضافة الى بؤر ماضية ، اذ لم يتم التحكم في الأوبئة مما سبب في انتشار المناطق الموبوءة بسبب التحولات في التنمية و السكان . وفي الدول الغربية يتزايد الانتشار بسبب عدوى فايروس نقص المناعة البشرية المرافق للشمانيا HIV-Leishmania والسياحة. في السنوات الأخيرة أصبحت العدوى المترافقة مع فايروس نقص المناعة البشرية تشكل تهديدا خطيرا في جنوب غرب أوروبا 1.5-9.5% من مرضى الإيدز .

بين Van Thiel (2010) أنه منذ عام 1993 فان المناطق التي تتوطن – اللشمانيا توسعت بشكل كبير ، يرافقه زيادة حادة في عدد الحالات المسجلة بسبب الانتشار الجغرافي ويرجع ذلك إلى عوامل تتعلق معظمها في التنمية. وتشمل هذه المشاريع الضخمة ، الهجرة من الريف إلى المناطق الحضرية ، المشاريع التي من صنع الإنسان مع الأثر البيئي، مثل السدود وشبكات الري و الآبار ، فضلا عن إزالة الغابات حيث تسهم أيضا في انتشار داء اللشمانيا .

أكد Cruz (2002) ان الإيدز و الظروف الأخرى المثبطة للمناعة تزيد من خطر إصابة الانسان باللشمانيا الحشوية حيث تساعد على تطور المرض . وفي مناطق معينة من العالم يحذر من خطر العدوى المشتركة بفيروس نقص المناعة الآخذ في الارتفاع بسبب التغيرات الوبائية .

اما وبائيات داء اللشمانيا الجلدي في إيران Anthroponotic Cutaneous Leishmaniasis (ACL) الذي تسببه *L. tropica* يحدث في 14 مدينة في الوسط والجنوب و الجنوب الشرقي و الشمال الشرقي من البلاد، و ناقلاته هو *P. sergenti* وليس هناك دليل على أي مضيف خازن غير الانسان في حين أن داء اللشمانيا الجلدي حيواني المنشأ (ZCL) Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis التي تسببها *L. major* انتشرعلى نطاق واسع في الوسط والجنوب و الشمال و الشمال الشرقي، وارتفعت عدد الحالات الـ CL المسجلة من 25729 في عام 2008 إلى 44792 في عام 2009 . (Davami *et al* ., 2010)

وفي الاردن هنالك 300 حالة سنويا ، يحدث ACL في منطقة الحدود الشمالية ، حيث يتواجد في قرى ريفية على افتراض وجود مضائف خازنة غير البشرية ، اما الـ ZCL فينتشر على نطاق واسع في وادي الأردن بشكل خاص في منطقة سويمة منتجع على البحر الميت (WHO,2008) .

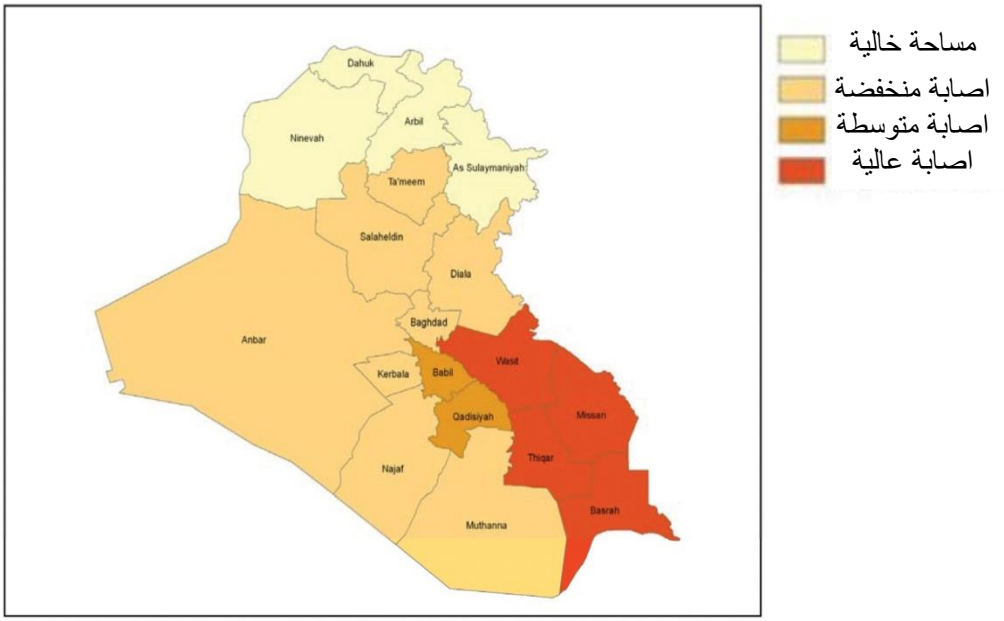
في المملكة العربية السعودية تنتشر الـ *L. tropica* في الجزء الجنوبي الغربي من البلاد، و ناقلاتها هي *P. sergenti* في حين ZCL التي تسببها *L. major* يحدث بشكل رئيسي في المركز

وشرق البلاد. ناقلاته هي *P. papatasi* . وقد انخفض العدد السنوي الى النصف من 4000 حالة منذ أوائل 1980 (WHO,2008) . داء اللشمانيا هو في الغالب مرض في العالم النامي ، و نادرا ما يعرف في العالم المتقدم كعدد قليل من الحالات ، ومعظم هذه الحالات تظهر في القوات المتمركزة بعيدا عن أوطانها . حيث تم الإبلاغ عن داء اللشمانيا من قبل القوات الامريكية المتمركزة في المملكة العربية السعودية و العراق منذ حرب الخليج في عام 1990، بما في ذلك داء اللشمانيا الحشوي (Ojha ,2007).

في المملكة العربية السورية وجد بان *L. tropica* التي تسبب ACL لا يزال متوطناً في حلب ، وكذلك في إدلب ، اللاذقية ، وحماة و مدينة دمشق. ان الـ ACL تمثل 90 ٪ من جميع حالات CL، ناقلاته هي *P. sergenti* وليس هناك دليل على وجود مضيف خازن غير بشري . الـ ZCL بسبب *L. major* تحدث في المناطق الريفية بالقرب من دمشق ، دير - الزور و آل الحسكة ، و ناقلاته هي *P.* papatasi والمضيف الخازن هي القوارض ، ، وحالات الـ ZCL يمثل 10 ٪ من الحالات CL و العدد السنوي ل حالات CL المسجلة أكثر من 20,000 (WHO,2008) .

إن وبائيات داء اللشمانيا الجلدي في العراق أمرمعقد نتيجة اختلاف دورات الحياة ، والمضائف الخازنة، ناقلات ذباب الرمل ، المظاهر السريرية و الاستجابة للعلاج ، و تعدد انواع اللشمانيا المتداولة في المنطقة الجغرافية نفسها (Al–Obaidi, 2000) .

في العراق داء الـ CL متوطن بشكل رئيسي في جنوب البلاد وخاصة في محافظة واسط وميسان بينما اظهرت المنطقة الشمالية ايضاً 2000 حالة سنوية تحدث في ديالى وكركوك و صلاح الدين وبغداد - الكرخ وهذه الحالات في تزايد بسبب حركة الناس عبر الحدود المفتوحة و انخفاض في المراقبة (AL- Aubaidi , 2007) مع إصابة البلدان الأخرى التي تحيط في العراق مثل إيران والأردن والسعودية و سورية (WHO,2008). وهناك نوعان من اللشمانيا الموجودة في العراق *L. tropica* التي تسبب داء اللشمانيا الجلدي بشري المنشأ anthroponotic (ACL) و *L. major* التي هي مصدر اللشمانيا الجلدي حيواني المنشأ zooponotic (ZCL) ومن ناحية أخرى هناك حالات اصابة بـ ACL و ZCL في العراق حيث تم العثور على ACL بشكل رئيسي في مناطق الضواحي (WHO, 2009 a). وكان الـ CL معروفا في بغداد في هذه المدة حيث كان يعتقد ان بغداد منطقة مستوطنة و موبوءة لهذه الأمراض في العراق (Khalaf, 2010 ; Al–Aubaidi, 2007)



شكل (2-2) : توزيع الاصابة باللشمانيا الجلدية على محافظات العراق لعام 2007 (WHO, 2008)

2-8 تشخيص المرض Diagnosis of Leishmaniasis

يعتمد التشخيص في داء اللشمانيا الجلدي على الحالة المرضية والفحص السريري، ويتم تأكيده بالكشف عن الطفيلي (Asgari *et al* .,2007) .

2-8-1 التشخيص المجهري المباشر

تؤخذ العينة من الآفة بعزلها أو أخذ خزعة لكشف الشكل اللاسوطي Amastigotes للطفيلي ، وتُفحص مجهرياً بعد تصبيغ المسحة بصبغة Romnowsky's stain او بصبغة Haemotoxylin stain اوصبغة Eosin stain او صبغة Immunoperoxidase stain التي تكون اكثر حساسية في حالة اللشمانيا الجلدية Cutaneous leishmania. هذا الفحص سهل وقليل التكلفة ويتطلب خبرة بسيطة . تصل حساسيته إلى 70-80% (Motazedian *et al* ., 2010) .

2-8-2 الزرع The culture

استعملت اوساط زرعية مختلفة لتنمية اللشمانيا الجلدية وقد اخذت عينات من اللشمانيا والجلدية المخاطية Mucocutaneous leishma*nia* بواسطة تقنية Fineneedle aspiration (Rassi *et al* ., 2001; Razmjou *et al* ., 2009) .

اما الطور امامي السوط Promastigotes فتتم زراعته على أوساط خاصة مثل وسط Novy, MacNeal-Nicolle(NNN) بدرجة حرارة 26°م ، وذلك يتطلب مختبراً مجهزاً بحاضنة مع تبريد وخبراتٍ كافية، ووقتاً طويلاً ، حيث تؤخذ عينات من البثرة والاوساط ثنائية الطور التي تستخدم في الزراعة لانتاج اعداد كبيرة من الطفيليات حيث تم الحصول على 10^{10} خلية / مل وان المكون الاساسي في هذه الاوساط هو دم الارنب الذي يفضل على الانواع الاخرى . وحساسية الزرع هنا أقل منها في الفحص المجهري المباشر (Pourmohammadi *et al*., 2010) .

9-2 جينوم اللشمانيا Leishmania Genome

1-9-2 الجينوم النووي Nuclear Genome

ذكر(Ivens *et al*.,(2005 أن موضوع جينوم *Leishmania major* بدأ في عام 1994، ولم يحقق نجاحا كبيرا حينها . فالتسلسل الجيني لـ *Leishmania major* انتهى في حين بدأ التقدم في معرفة التسلسل الجيني للـ *L. braziliensis* و *L. infantum* .

ان جينوم *L. major* يحدد في 32.8 Mb موزعة على 36 زوج من الكروموسومات. في "العالم القديم" انواع اللشمانيا لديها 36 أزواج كروموسوم (Mb 2.8–0.28) . في حين أن 'New World species لديها 34 أو 35 ، مع الكروموسومات 8 و 29 و 20 و 36 ، تذوب في المجموعة *L. mexicana* و20 و 34 في المجموعة *L. braziliensis* تكون الكروموسومات خطية بين 200 و 4000 kb في الطول ، وتمتلك التيلوميرات ، ولكن لم يتم تشخيصها (Abdalla *et al*. ,2003).

ان التنوع في حجم الكروموسوم هو سمة لبعض أنواع اللشمانيا ، حتى بين الكروموسومات المتماثلة مما يعقد استخدام النمط النووي للدراسات التصنيفية. من جينوم *L. major* ، 911 RNA جين ، 39 جينات كاذبة و8272 جينات مشفرة للبروتين (36٪ من التي لها وظيفة افتراضية). الجينوم الذي يتكون من G+C يكون 59.7٪ (Ivens *et al*., 2005).

وغالبا ما تنظم جينات اللشمانيا في صفوف متوازية جنبا إلى جنب أو على الأقل أن يكون اثنين أو أكثر من نسخ تنتشر عن طريق الجينوم . وكشف تحليل التسلسل كثافة واحد من الجينات لكل kb3.5 . وقد أثبتت الدراسات السابقة أن 30٪ من الجينوم يتكون من عناصر المتكررة ، ما يقرب من نصفها هي مكررات telomeric/subtelomeric ، والباقي ان جينات المتكررة وغيرها من متواليات بسيطة متكررة (Dinse *et al*.,2001) .

لا تحتوي اي من الجينات المشفرة لبروتينات اللشمانيا والتي درست حتى الآن على الإنترونات introns ، وتبسيط تشخيص هذه الجينات في الحمض النووي الجيني DNA . وكشفت المقارنات الأولى مع الجينومات الاخرى بان هذا النظام الجيني يتم حفظه للغاية بين 30 نوع من أنواع اللشمانيا (Parvizi *et al*.,2008).

ومع ذلك، وعلى مستوى عال من تعدد الأشكال polymorphism موجود في تسلسل الحمض النووي . في الواقع Schonian *et al* (2009) اوضح أن الاختلاف في تسلسل DNA النووي يستند الى انماط محددة بين الوصلات الرئيسية للشمانيا بنسبة من 13٪ إلى 25٪، وهو مشابه لتلك التي لوحظت بين الأنواع الحيوانية التي تباعدت 10-80 مليون سنة مضت.

أشارت العديد من الدراسات إلى أن الكروموسومات اللشمانيا هي بشكل رئيسي متضاعفة diploid ، مع بعض الكروموسومات التي تظهر منفردة aneuploid (Lambson *et al*.,2000) . حتى منتصف 1990، اعتبرت اللشمانيا كائن حي مفرد الصيغة الصبغية. الآن تم قبول صفة المضاعفة في الليشمانيا على نطاق واسع (Aransay *et al*.,2000). ان مستوى التضعيف تغير منذ ان اصبح تضخيم الجينات آلية متكررة للشمانيا المقاومة لفعل السموم او الضغوط البيئية (Yehia *et al*.,2012) .

لاحظ Dabirzadeh *et al*.,(2012) أن هذه الظواهر المتكررة نسبيا تحول اللشمانيا الى اختيارية facultative او منفردة عابرة transient aneuploids. على الرغم من أن بلمرة RNA الكلاسيكية الثلاثة (pol I, II and III) شخصت في *trypanosomatids* (Tashakori *et al*.,2006) ، اللشمانيا تظهر مزيج غير عادي من التعبير الجيني (Parvizi *et al*.,2010) . في *trypanosomatids*، بما في ذلك اللشمانيا معظم النسخ الجيني هو متعدد polycistronic (Dinse *et*

al.,2001) ، تليها تفاعلات متقدمة تتضمن الاقتران للـ transsplicing وتذييل بعديد الأدينيلات polyadenylation. الجينات في البداية تنسخ الى polycistronic كبيرة بادئات الـ 60 kb RNAs او اكثر في الطول ، والتي تنشطر إلى من mRNAs monocistronic بفعل اثنين من تفاعلات التداخلات الجينية RNA تفاعلات الانشطار ، عبر الربط من 39 النيوكليوتيدات تربط اولا لتوليد النهاية 50 من كل من mRNAs، و30 leavage/polyadenylation لإنشاء النهاية 30 (Dabirzadeh et al., 2012).

تحدث كفاءة الربط 50 trans-RNA عادة في تسلسلات قصيرة يسبقها الـ polypyrimidine . ويعرف القليل حول آلية بدء النسخ في *trypanosomatids* ، وفقط عدد قليل من البادئات حددت وظيفتها (Marfurt *et al*., 2003)..

اوضح Garcia *et al* (2005) أن العمليات المختلفة لتحوير البروتين تحدث داخل اللشمانيا (phosphorylation , glycosylation and lipidation for stabilization and/or activation) . وقد وصفت ايضا عدة تحولات رئيسية ويعتقد بانها اساسية ، وهي glycosylphosphatidylinositol (GPI) إضافة anchor ، وacylation (بما في ذلك Nmyristoylation وpalmitoylation) وprenylation ، وكلها تسهل الارتباط مع الغشاء و / أو تداخلات بروتين – بروتين .

2-9-2 جينوم منشأ الحركة Kinetoplast DNA

kDNA هو الحمض النووي للمايتوكوندريا DNA of the Kinetoplastida يشكل 10-20٪ من DNA الكلي. وهو شبكة من DNA دائري متصل ، وتنقسم الى فئتين: The homogenous maxicircles (25-50 جزيئة من kb20) وheterogeneous minicircles (kb 0.8) ، والتي لها عدد (104) نسخة .

ان maxicircle وظيفته مشابهة اونظيره للـ mitochondrial DNA على الرغم من دوره في تحرير بقايا اليوراسيل uracil الـــى نيوكليوتيدات RNA المراســل (mRNA) (Tashakori *et al*.,2006).

2-10 اختبارات التشخيص باستخدام تقنية الـ(PCR) ذات الحساسية والنوعية العالية

لقد قدم التطور الحديث في علم البيولوجيا الجزيئية طرقاً بديلة لتشخيص و تنميط اللشمانيا لتجنب مساوئ الطرق التقليدية ، فتقنية PCR (Polymerase Chain Reaction) هي طريقة نوعية 100% وذات حساسية عالية (Bustin ,2002) ، تلائم تشخيص جميع أمراض اللشمانيا باستخدام مختلف الأنماط من العينات الحيوية بما فيها القرح الجلدية و الدم المحيطي و خزع العقد اللمفاوية ومواد الخزعات الاخرى (Davami *et al* .,2011) ، كما يمكن استخدامها لكشف الطفيلي في الحشرات الناقلة والمستودعات الحيوانية . ويتطلب نجاح مشروع مكافحة اللشمانيا الاعتماد على طرق موثوقة وعملية لتشخيص و تنميط اللشمانيا عند الانسان و الحيوانات المستودع و الحشرات الناقلة . كما أن هذه الطريقة فعالة في الدراسات الوبائية حيث يمكنها كشف الأخماج عند الأفراد الحيوانات المستودع حيث ان تكرار هذه الأخماج أعلى بكثير من تكرار الإصابة الصريحة بداء اللشمانيا (Parvizi and Ready ,2008) .

وتصل حساسية تقنية الPCR إلى أعلى حد ممكن نظرياً (0.1 فيمتوغرام) / X - 10150.1/ غرام من DNA اللشمانيا متجاوزاً إلى حد بعيد حساسية الطرق التقليدية .مما يسمح باستخدام هذه الطريقة في تشخيص اللشمانيا الحشوية باستخدام الدم المحيطي ، وتجنب مشاكل عزل نقي العظم و الطحال ذات المخاطر الكبيرة ، وتسمح بكشف التراكيز القليلة من الطفيلي في الدم عند متابعة المريض أثناء المعالجة (Ghasemian *et al* ., 2011) .

وهذه الطريقة فعالة في الدراسات الوبائية حيث يمكنها كشف الأخماج عند الأفراد الحيوانات المستودع حيث ان تواتر هذه الأخماج أعلى بكثير من تواتر الإصابة الصريحة بداء اللشمانيا (Mohammad *et al* .,2014) .

إن طريقة الPCR سريعة مما يسمح بإنقاص فترة إقامة المريض في المستشفى وبالتالي إنقاص التكلفة المادية . أثبتت التقنيات الجزيئية الحديثة مثل بصمات ال-PCR/ multiplex/ PCR-RFLP dot blot /DNA وطرق التهجين بالمسابر النوعية أثبتت فائدتها في التحديد الدقيق لأنواع اللشمانيا وفي تنميطها مما يشكل تقدماً هاماً و عملياً في الدراسات و التقصيات الوبائية في مجال الصحة العامة (Fakhar *et al* .,2010) .

تقوم فكرة تقنية ال PCR إلى القيام بتضخيم جزيئات قليلة من الحمض النووي DNA ، بعد استخلاصه من خلايا أو سوائل الجسم وبالتالي الحصول على كميات كبيرة منه والتي تمكننا من إجراء التحليل عليه. يمكن اعتبار تقنية PCR ترجمة مبسطة لعملية استنساخ الحامض النووي DNA أثناء الانقسام الخلوي. ولكي يتم هذا الاستنساخ، لا بد من توفر مواد معينة تساعد على ذلك:

1. البادئات Primers وهي عبارة عن نيوكلوتيدات قليلة 20 – 18 Oligonucleotides لها أساس آزوتي قادرة على الارتباط مع الأسس الآزوتية للحامض النووي المراد تضخيمه، وذلك في منطقة ذات ترتيب مميز ونوعي غير متبدل للأسس الازوتية في الحامض النووي أو ما يعرف بمنطقة عالية الحفظ Highly Conserved Region .

2. كميات وافرة من النيوكليوتيدات ثلاثية الفوسفات منقوصة الأوكسجين

(dATP,dCTP,dGTP,dTTP) Deoxynuleoside triphosphates(dNTPs)

3. أنزيم البوليميرايز Polymerase مقاوم للحرارة المرتفعة، وأهمها Taq Polymerase المستخلص من بكتيريا تعيش في الينابيع الحارة *Thermus aquaticus*.

4. محاليل واقيه Buffers

5. شوارد مناسبة، أهمها شاردة المغنيزيوم Mg+2 التي تعتبر عامل متمم Cofactor لأنزيم البوليمراز (Bustin ,2002) .

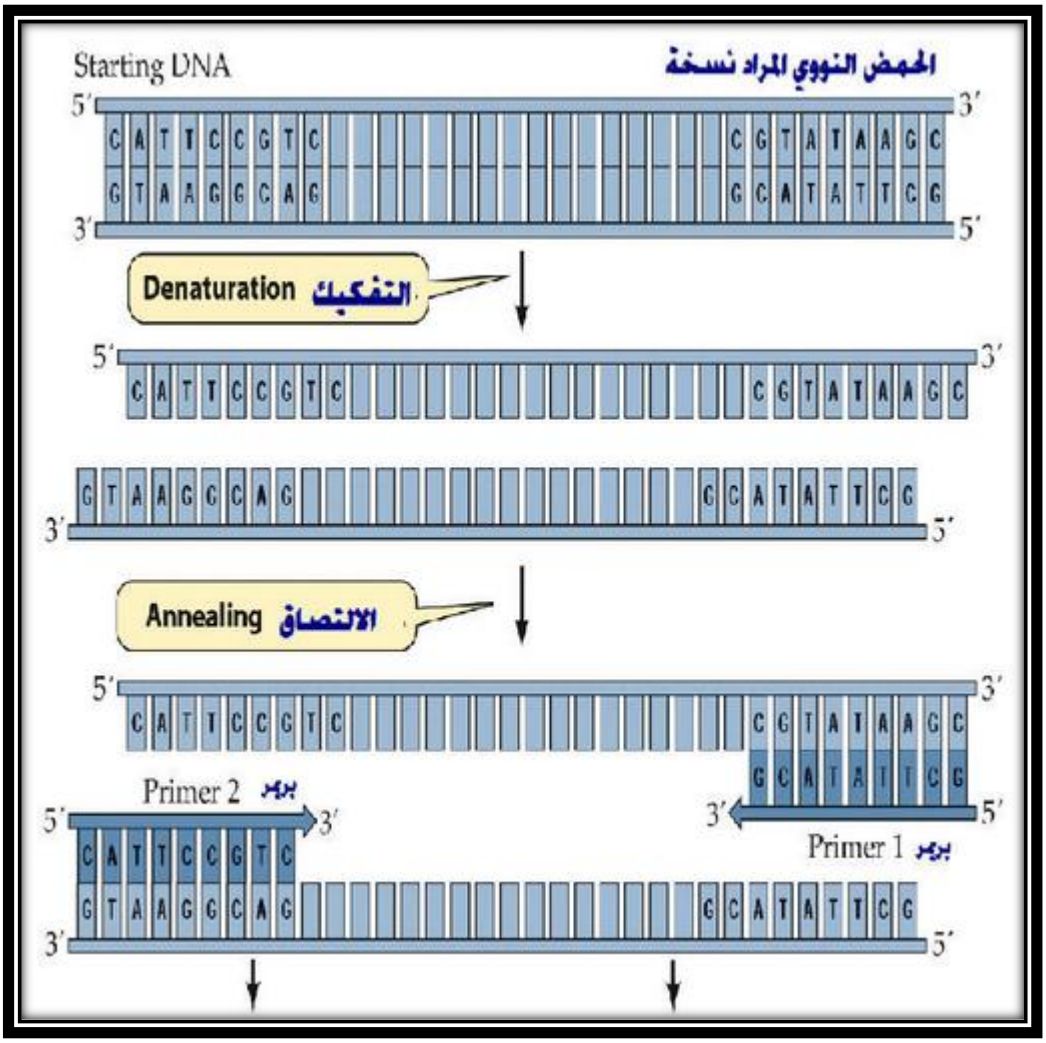
*** عملية النسخ :**

بعد وضع الحمض النووي المراد نسخة مع البريمر و و إنزيم البوليمريز و مجموعة مع الأحماض النووية في أنبوب داخل جهاز التحكم الحراري فان هناك ثلاث مراحل منفصلة تمر بها عملية النسخ: شكل (2-3)

1. مرحلة التفكيك Denature : رفع الحرارة إلى 94 ºم وذلك لفك الحمض النووي (DNA) الأصل .

2. مرحلة الالتصاق anneal : إنزال الحرارة إلى ما بين 55-60 م ليقوم البريمر بالألتصاق فيزيائياً بواسطة الروابط الهيدروجينية مع الحمض النووي (DNA) الأصل .

3. مرحلة الامتداد extend : ثم يقوم برفع درجة الحرارة إلى 75 م ليقوم البولمريز بعمله في بناء الحمض النووي (DNA) الجديد . وتعتمد هذه التقنية على قدرة انزيم الـ DNA polymerase على عمل نسخة لمنطقة محددة من احدى جديلتي الـ DNA بوجود بادئات من الحمض النووي، ومزيج من المواد المساعدة لتقوم بعملية التضاعف من خلال عدد من الدورات (من30 إلى 40) في جهاز دوري حراري مبرمج بحيث نحصل على كمية من الهدف تسمح بالكشف عنها (حوالي بليون نسخة) وصولاً إلى مضاعفة التسلسل المستهدف وتحديده. فتشخيص حالات الحمى المالطية، على سبيل المثال، التي تسببها بكتيريا البروسيلا، أصعب عادة من غيرها، ويلزمها تشخيص مايكروبيولوجي لتأكيد الحالة السريرية. ولكن نتائج مزارع الدم (المعيار الذهبي لتشخيص هذا المرض) تكون إيجابية في 50-70% من الحالات فقط وتحتاج ما بين ثلاثة إلى أربعة أسابيع أحيانا قبل الحصول على نتيجة ايجابية. في مقابل ذلك فقد ثبت أن استخدام تقنية التفاعل التسلسلي البوليميريزي أكثر حساسية من مزارع الدم وأكثر دقة من الاختبارات المصلية التقليدية لتشخيص هذا المرض حيث تظهر النتائج خلال ساعات. وتعد هذه المراحل الثلاث دورة كاملة وفيها يصبح الحمض النووي (DNA) الأصل قد تضاعف ، وتعتمد كمية ناتج الحمض النووي (DNA) على عدد الدورات (Fakhar *et al* .,2010).



شكل (2-3) يمثل دورة كاملة في جهاز الـ PCR يتضاعف فيها الحامض النووي الى شريطين (Fakhar *et al* .,2010).

11-2 الدراسات المناعية

*** التقييم الكمي Quantitative evaluation :**

لاجل القيام بالتقييم الكمي للأضداد او المستضدات الخاصة بالميكروب المطلوب يتم عمل منحنى قياسي بين قيمة الكثافة الضوئية (O.D.) و تراكيز محاليل السيطرة القياسية، ومن خلال هذا المنحني يتم استخراج معادلة المنحني القياسي. وبذلك يمكن قياس تركيز الضد او المستضد اعتمادا على الكثافة الضوئية المقاسة بالمطياف (Ryan *et al* ., 2002) .

*** التقييم النوعي Qualitative evaluation :**

لاجل التقييم النوعي يتم قياس الكثافة الضوئية لمصل المرضى و يقارن بقيمة الكثافة الضوئية لـ-Cut off standard . اذا كانت قيمة الكثافة الضوئية للعينة اعلى من قيمة cut-off تعتبر العينة موجبة. اما اذا كانت قيمة الكثافة الضوئية للعينة اقل من الـ cut-off فتعتبر العينة سالبة.(Ryan *et al* ., 2002) .

12-2 الاستجابة المناعية لعدوى اللشمانيا Immune Response to *Leishmania* Infection

يمكن ان تقسم الى :

الاستجابة المناعية الخلوية Cellular immune Response

الاستجابة المناعية الخلطية Humoral immune Response

1-12-2 الاستجابة المناعية الخلوية Cellular immune Response

يشير Erb *et al.*,(1996) الى أهمية الاستجابة المناعية الخلوية التي تلي فعل اللقاح المستخدم ضد داء اللشمانيا الجلدي كما يؤكد (Chakkalath *et al.*,(1995 على ضرورة تقييم المناعة الخلوية للقاحات المستخدمة ضد داء اللشمانيا الجلدي ، الشفاء الذاتي من الخمج بطفيليات اللشمانيا الجلدية للعالم القديم *L. major* و *L. tropica* ينتج عنه مناعة كفؤة (Solid immunity) ، حيث ان هناك تطوراً ملحوظاً في التفاعلات المتوسطة بالخلايا إذ إن الشفاء من المرض يرتبط مع مناعة خلوية ذات امد طويل وهناك العديد من الخلايا التي تحدد المناعة الخلوية في اداء اللشمانيا وتشمل :

a – الخلايا اللمفاوية التائية المساعدة (CD_4) T- Helper

ان كيفية سيطرة الخلايا التائية المساعدة على الخمج بطفيلي اللشمانيا يمكن ان يساعد في تطوير علاج مؤثر أو لقاح ناجح ضد داء اللشمانيا . في داء اللشمانيا الخلايا المؤثرة هي الخلايا اللمفاوية التائية المساعدة هذه الخلايا ليست متماثلة وانما يمكن تمييزها حسب وظائفها الى نوعين الخلايا اللمفاوية التائية المساعدة النمط الاول Th_1 والخلايا اللمفاوية التائية المساعدة النمط الثاني Th_2 (Overath and Harbecke , 1993) .

ان الخلايا اللمفاوية التائية تنتج عوامل ذائبة تسمى الحركيات اللمفاوية Lymphokines والتي تؤدي اثرا بالغ الاهمية في الاستجابة المناعية ، حيث تفرز خلايا Th_1 كل من Interferon-gamma (IFN-γ) ، و Interleukin-2 (IL-2) وعامل الورم التنخري بيتا (TNF-β) اما الخلايا التائية

المساعدة النمط الثاني Th_2 فتفرز Interleukin-4 (IL-4) , Interleukin-5 (IL-5) , Interleukin-6 (IL- 6) , Interleukin-10 (IL-10) وInterleukin-13 (IL-13) . وقد لوحظ وجود علاقة بين كل من المقاومة ضد داء اللشمانيا في الفئران وخلايا Th_1 من جانب والحساسية للمرض وخلايا Th_2 من الجانب الآخر (Belkaid *et al*., 2002).

ولقد أظهرت الدراسات على نماذج الفئران لسلالات مختلفة منها ان المقاومة ضد الخمج بطفيلي اللشمانيا الجلدية ترتبط مع ارتفاع مستويات IFN-γ وانخفاض مستويات IL-4 على افتراض ان IFN-γ هو العامل الذي يسبب الوقاية من المرض وذلك لان IFN-γ وعوامل اخرى مثل IL-2 والعامل المنشط للبلاعم تتوسط عملية تنشيط وتجميع البلاعم وبالتالي تحطيم الطفيلي ، اما IL-4 فيعد العامل الذي يسبب تفاقم المرض وذلك لان IL-4 وIL-10 تقوم بتثبيط الحركيات اللمفاوية المفرزة من قبل خلايا Th_1 كما وتثبط تحول وانقسام خلايا Th_1 المسؤولة عن الوقاية ضد المرض ، حيث ان حقن IFN-γ مباشرة في الآفة الجلدية يؤدي الى تضاؤلها بينما حقن IL-4 مباشرة في الآفة يؤدي الى تفاقم الآفة . (Launois *et al* .,1998)

ويؤكد ان الاختلاف السريري لداء اللشمانيا يرتبط مع الانماط المختلفة للمدورات اللمفاوية ونظراً لأهمية انترفيرون نوع كاما في المقاومة ضد داء اللشمانيا فقد اكد (2003) Reed *et al* على ضرورة ان يكون اللقاح ضد داء اللشمانيا محفزاً لانتاج مستويات عالية من الانترفيرون كاما , إلا أن هناك ملاحظات تؤكد على ان انترفيرون نوع كاما ضروري لكنه غير كافي لتوليد الحماية بمفرده .

b – الخلايا اللمفاوية التائية القاتلة T- Cytotoxic (CD_8) والخلايا القاتلة الطبيعية Natural killer cell(NK)

هناك بعض الحقائق تؤكد على دور الخلايا اللمفاوية القاتلة (Tc) ، هذه الخلايا لها دور مهم في الوقاية ضد الخمج بداء اللشمانيا وذلك لقابليتها على انتاج IFN-γ. ان الحماية المتوسطة بالخلايا التائية تبدو غير مهمة خلال الخمج الاولي بطفيليات اللشمانيا الجلدية ، حيث ان الفئران المقاومة والناقصة الخلايا التائية القاتلة تمتلك القدرة على شفاء الآفة الجلدية بصورة ذاتية ، وذلك لان الخلايا التائية المساعدة تنشط خلال الاصابة الاولى بطفيليات اللشمانيا الجلدية ، حيث تلعب هذه الخلايا دور مهم في شفاء الآفة الجلدية وعلاوة على ذلك فهي تسيطر على الطفيليات المتبقية في الأنسجة اللمفاوية اما المقاومة

في الاصابة الثانية باللشمانيا الجلدية فترتبط بفاعلية كل من الخلايا التائية المساعدة والقاتلة (Stobie *et al*., 2000) .

ان الخلايا اللمفاوية القاتلة اساسية في تحفيز المناعة لدى الفئران الحساسة بعد تمنيعها ضد داء اللشمانيا الجلدي , حيث ان هذه الوقاية الناتجة عن تمنيع الفئران ضد خمج لاحق (خمج التحدي) تكون متوسطة من قبل انترفيرون نوع كاما المنتج من قبل الخلايا اللمفاوية المساعدة وليست الخلايا اللمفاوية القاتلة وربما يعود ذلك الى قلة عند الخلايا التائية المساعدة والذي يسمح للخلايا التائية القاتلة في التوسط في هذه المناعة . وان الممرضات المقتولة المستخدمة كلقاحات لتمنيع البشر ضد داء اللشمانيا تؤدي الى زيادة في مستوى الخلايا القاتلة ومثل هذه الزيادة في الخلايا اللمفاوية القاتلة يمكن ملاحظتها بعد علاج داء اللشمانيا، ان تمنيع المضيف الحساس ضد اللشمانيا يجب ان لا يهدف الى تحفيز الخلايا اللمفاوية التائية المساعدة فقط وانما الى تحفيز الخلايا اللمفاوية التائية القاتلة ايضا (Skeiky *et al* ., 2000) .

من الخلايا الاخرى ذات الاهمية في داء اللشمانيا هي الخلايا القاتلة الطبيعية (NK) Natural Killer cells وقد اشار Belkaid *et al* .,(2001) الى ان الخلايا القاتلة الطبيعية تنتج IFN-γ بصورة مبكرة خلال الخمج بطفيليات اللشمانيا الجلدية حيث تعد هذه الخلايا المصدر الاولى (Primary Source) لانترفيرون كاما المسؤول عن تنشيط البلاعم ومنع انتشار الطفيلي ونموه حيث ان كل من الانترفيرون نوع كاما وانترلوكين – 2 والعامل المنشط للبلاعم تساعد في عملية تنشيط البلاعم وبالتالي تحطيم الطفيلي .

c - الخلايا المقدمة للمستضد Antigen Presenting Cells (APC)

مصدر الخلايا البلعمية هو خلايا (Promonocyte) المنتجة في نقي العظم وهذه تتخصص الى خلايا وحيدة النواة (Monocyte) في الدم المحيطي التي تعد اصل الخلايا البلعمية الموجودة في الانسجة المختلفة ، حيث تنتشر بصورة واسعة في الانسجة اللمفاوية وغير اللمفاوية وبسبب قابليتها على البلعمة فهي مهمة في تقديم المستضدات الى خلايا الجهاز المناعي الاخرى ، وتلعب هذه الخلايا دوراً مهماً في توجيه الاستجابة المناعية للخمج بطفيلي اللشمانيا بالإضافة إلى إنتاجها انترلوكين – 12 المسؤول عن تمايز الخلايا اللمفاوية التائية المساعدة (Belkaid *et al* ., 2002) .

ان الخلايا البلعمية هي خلايا المضيف (host cell) لطفيلي اللشمانيا بأنواعه التي ذكرت سابقاً إذ أنها الخلايا المناسبة لتكاثر الطفيلي , حيث ان وجود الطفيلي داخلها يجعله بعيداً عن وسائل الدفاعية للجسم ، فالطفيلي يتكاثر داخل هذه الخلايا دون ان يتضرر بالأنزيمات الحالة حيث إن الظروف داخل

هذه الخلايا يجب أن تتغير بشكل معين لتكون فعالة في القضاء على الطفيلي وهذا التغير يشمل التفاعل بين الحركيات اللمفاوية المنتجة من قبل الخلايا التائية وبين الخلايا التائية المساعدة من النمط الأول وبين الغشاء البلازمي للبلاعم حيث أن كل من انترفيرون نوع كاما ، انترولكين – 2 والعـامل المنشـط للخلايا البلعمية (MAF) تقوم بعملية تنشيطها وتجميعها وبالتالي قتل الطفيلي (Caceres *et al* ., 1993) .

لقد بين Sacks & Noben-Trauth (2002) اهمية هذه الخلايا المنشطة في الوقاية ضد داء اللشمانيا حيث الكثير من الابحاث النسيجية في الأنسان والحيوان تشير الى ان هذه الطفيليات تموت داخلها كما أشار إلى أن هذه الخلايا تمارس نشاطاً مضاداً للطور أمامي السوط للشمانيا الجلدية والإحشائية بواسطة آلية معتمدة على الاوكسجين (O_2) والتي تنتج بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) السام ، وان قدرة هذه الخلايا على قتل أنواع طفيلي اللشمانيا يختلف حسب اختلاف انواع اللشمانيا .

2-12-2 الاستجابة المناعية الخلطية Humoral lmmune Response

ان الاستجـــابة المناعية الخـلطية في داء اللشمانيا الجلدي للعالم القديم المتسبب عـن الطفيليات *L. major* , *L. tropica* تكون ضعيفة على الرغم من إمكانية تكوين أجسام مضادة نوعية فقد لوحظ بأن للأضداد دور بسيط في تحديد سير داء اللشمانيا الجلدي . ان نقل المصل من فئران ممنعة إلى أخرى طبيعية ليس له اي تأثير واقي ضد خمج لاحق بطفيلي اللشمانيا الجلدي في الحيوانات المتلقية , كما أن الفئران من سلالة (bozzi AB/L) والتي تمتاز بعدم امتلاكها استجابة مناعية خلطية تكون مقاومة للخمج بطفيلي *L. major* . وان التمنيع ضد خمج طفيليات *L. tropica* و *L. mexicana* في الفئران يؤدي الى ارتفاع مستوى الأضداد المضادة للطفيلي ولكنها غير مقترنة بالوقاية ضد الاخماج بهذه الطفيليات . ان معاملة الحيوانات بمادة Cyclophosphamide المثبطة للاستجابة المناعية الخلطية يؤدي الى زيادة حدة الآفة الجلدية وإطالة الزمن اللازم للشفاء . وقد أمكن استعمال الاجسام المضادة أحادية النسيلـــة Monoclonal Antibodies لوقايـــة فئران (Balb / c) ضد خمج طفيلي *L. mexicana* حيث يعتقد ان هذه الاضداد تزيد قدرة هذه الخلايا على قتل الطفيلي خارج الجسم الحي ، كذلك ان كل انواع طفيلي اللشمانيا تنشط المتمم بواسطة المسلك البديل Alternative Pathway المعتمدة على غياب الاضداد وإن عملية البلعمة (بلعمة اللشمانيا) تستمر بغياب عوامل المصل . (Rafati *et al* .,2006)

13-2 عملية البلعمة في داء اللشمانيا Phagocytosis in Leishmania

مصدر الخلايا البلعمية هو خلايا Promonocyte المنتجة في نقي العظم وهذه تتخصص الى خلايا وحيدة النواة Monocyte في الدم المحيطي التي تعد أصل الخلايا البلعمية الموجودة في الانسجة المختلفة(Appelberg , 2007) . ان الخلايا البلعمية تنتشر بصورة واسعة في الانسجة اللمفاوية وغير اللمفاوية وبسبب قابليتها على البعلمة فهي مهمة في تقديم المستضدات الى خلايا الجهاز المناعي الأخرى . وتلعب هذه الخلايا دورا مهما في توجيه الاستجابة المناعية لطفيلي اللشمانيا حيث تميز هذا الخلايا المستضدات الغربة عن طريق Toll-like receptors حيث تهاجمها وتقتلها ، فهي بذلك تعد خلايا حساسة لبدء الاستجابة المناعية ضد الطفيليات المهاجمة بالإضافة الى انتاجها IL-12 المسؤول عن تمايز الخلايا اللمفاوية التائية المساعدة . كما تعمل على تقديم epitopes العائدة الى المستضد الغريب تقدمها الى خلايا Th1 وذلك بترافقها مع جزيئات معقد التوافق النسيجي صنف II التي يتم تعبيرها على سطح الخلايا المقدمة للمستضدات APC. (Hsiao, 2011)

ان الخلايا البلعمية هي المضيف host cell لكل أنواع طفيلي اللشمانيا اذا انها الخلايا المناسبة لتكاثره ، حيث ان وجود الطفيلي داخل الخلايا البلعمية يجعله بعيداً عن الوسائل الدفاعية للجسم ، حيث ان الطفيلي يتكاثر داخل هذه الخلايا دون ان يتأثر بالانزيمات الحالة .

يحاول الطفيلي داخل هذه الخلايا ان يعمل له غلاف يحيطه ويحميه من مؤثرات تلك الانزيمات ، بينما تعمل الخلايا البلعمية الى محاولة تغيير الظروف داخلها بشكل فعال للقضاء على الطفيلي ومن هذه المحاولات التفاعل بين المحركات اللمفاوية المنتجة من قبل الخلايا التائية وبين الخلايا التائية المساعدة من النمط الأول وبين الغشاء البلازمي للخلايا البلعمية حيث ان كل من انترفيورن نوع كاما ، IL-2 والعامل المنشط للخلايا البلعمية MAF تقوم بعملية تنشيط الخلايا البلعمية وتجميعها وبالتالي قتل الطفيلي (Ueno ,2009).

لقد بين Behin and Mauel (1987) أهمية الخلايا البلعمية المنشطة في الوقاية ضد داء اللشمانيا حيث ان الكثير من البحثو النسيجية في الانسان والحيوان تشير الى ان هذه الطفيليات تموت داخل الخلايا البلعمية المنشطة ، كما أشار Murray (1981) الى ان هذه الخلايا تمارس نشاطاً مضاداً للطور امامي السوط promastigote للشمانيا الجلدية والاحشائية بواسطة آلالية المعتمدة على الاوكسجين O2 في القتل والتي تنتج بيروكسيد الهيدروجين H2O2 السام . وان قدرة هذه الخلايا على قتل أنواع طفيلي اللشمانيا تختلف حسب اختلاف نوع اللشمانيا المهاجمة . فمثلا يعد طفيلي *L. enritetti* هو اكثر حساسية من طفيلي *L. major* للقتل الداخل خلوي ، وعلاوة على هذا فان الطور عديم السوط Amastigote لطفيلي اللشمانيا يبدو اكثر مقاومة للقتل الدخل خلوي من الطور امامي السوط .

14-2 السيطرة على داء اللشمانيا Control of Lieshmaniasis

لقد وضعت الكثير من البرامج في دول العالم للسيطرة على داء اللشمانيا ولاسيما في المناطق التي يتوطن فيها المرض مثل إيران والسودان وسوريا (WHO,1990) وتتضمن هذه البرامج :-

1. رش المنازل بالمبيدات الحشرية للقضاء على الناقل للتقليل من خطر الخمج بداء اللشمانيا ولاسيما الناقل للطفيليات اللشمانيا البشرية. Anthroponotic Cutaneous Leishmaniasis

2. السيطرة على الحيوانات الخازنة لطفيليات اللشمانيا النوع الحيواني . Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis وذلك عن طريق إجراء تغييرات في البيئة كما هو الحال في الأردن وتونس، اذ أجريت عمليات ردم جحور الحيوانات وإزالة الأدغال من المناطق المحيطة بالسكان بمقدار 2-3 كيلو متر .

3. يعتمد النجاح في السيطرة على أساس معرفة وبائية داء اللشمانيا وبعض العادات المتبعة مثل النوم خارج المنازل من غير ناموسيات تحميهم من عضة ذبابة الرمل ، او رش المنازل بالمبيدات غير المناسبة للقضاء على الحشرة الناقلة .

4. اجراء الاختبارات الطبية والتشخيص المبكر ولاسيما في البؤر التي يتوطن فيها داء اللشمانيا وأجراء التجارب المختبرية لعزل وتشخيص أنواع الطفيليات مما يساعد في التخطيط للسيطرة على المرض .

5. لقد استخدم اللقاح في بعض دول العالم مثل إيران والاتحاد السوفيتي السابق فضلا عن إيجاد وسائل علاجية جديدة تبشر خيراً في السيطرة على داء اللشمانيا (Ali. and Afrin , 2007) .

1-14-2 اللقاحات Vaccination

اشار Armijos *et al.*,(2004) الى ضرورة ايجاد طرق مناعية او لقاحات لاسيّما بداء اللشمانيا لغرض السيطرة على هذا المرض ولاسيما في المناطق الموبوءة، ولا يوجد بديل اخر غير اللقاحات Vaccines للسيطرة على المرض وبالأخص بسبب صعوبة السيطرة على نواقل المرض والمضائف الخازنة له فضلاً عن وجود قسم كبير من مضار استخدام العقاقير المضادة للشمانيا كالمركبات الانتيمونيالية Antimonials التي لها تأثيرات جانبية سمية فضلاً عن ظهور سلالات جديدة مقاومة للعلاج .

ولسوء الحظ لم يتم انتاج أي لقاح مؤثر ضد اللشمانيا حتى الان ولكن المحاولات لا تزال مستمرة لايجاد اللقاح المناسب فقد اشارت تقارير منظمة (WHO) الى اجراء اختبار في ايران لبيان فعالية الجيل الاول من اللقاحات First-generation vaccines ضد اللشمانيا الجلدية التي هي عبارة عن حقنة مفردة

من امامية السوط الميته والمقتولة لطفيلي *L. major* مرتبطة مع جرعة صغيرة من Bacillus of Calmette and Guerin (BCG) بوصفها عاملاً مساعداً ولكن لم يظهر أي تأثير ماعدا في بعض الاشخاص الذين يحدث لديهم عملية تحول التفاعلات الجلدية الى انتيجين اللشمانيا Leishmanin Skin Test (LST) حيث لوحظ انخفاض حدوث المرض بنسبة (43%) ، والنتائج نفسها لوحظت في السودان عند اجراء محاولات ايجاد لقاح ضد اللشمانيا الاحشائية حيث لم يحدث أية عملية حماية ضد الإصابة بالمرض اما في البرازيل فقد جرت محاولات جديدة بإضافة مادة الشب Alum فضلاً عن لـ Bacillus-Calmette-Guerin BCG بوصفها عاملاً مساعداً لتقوية اللقاح (Blander and Horwitz ,1991) .

قام (Chen *et al*., (2001 واخرون بمحاولة ايجاد لقاح فعال بالاعتماد على الخلايا المناعية من نوع CD40 المرتبطة والتي تعد من المحفزات الفعالة لإنتاج Interleukin-12 (IL-12) من الخلايا المناعية Macrophages والخلايا المتفرعة Dendritic cells .

2-15 التمنيع والتلقيح ضد داء اللشمانيا

Immunization & Vaccination against Leishmaniasis

يبدو ان الأمل الوحيد للسيطرة على داء اللشمانيا Leishmaniasis هو التلقيح حيث ان اللقاح الفعال ضد بعض انواع اللشمانيا قد يتوفر خلال السنوات القليلة القادمة اي ان هناك عدة اسباب جعلت عملية اللقاح ضد داء اللشمانيا الجلدية ممكنا كنموذج ضد معظم اشكال المرض الاخرى (الأحشائي ، الجلدي المخاطي) .ومن ضمن هذه الأسباب:

1- الاستجابة الطبيعية الطويلة الأمد التي تلي الشفاء من المرض وهذا لا يعني ان المناعة مطلقة , لان تكرار الخمج سجل بعد شفاء القرحة الأولى

2- من الممكن حث الجهاز المناعي لمقاومة التكرار الخمج Reinfction في الحيوانات المختبرية .

3- سهولة تنمية طفيلي اللشمانيا في وسط خالي من الخلايا مما ادى الى سهولة التعامل مع هذا الطفيلي في تحضير اللقاح.

4- الطبيعة غير الخبيثة لدى اللشمانيا الجلدية (Handman *et al* ., 2005) .

2-15-1 انواع اللقاحات ضد داء اللشمانيا Types of Vaccines against Leishmaniasis

يبين الجدول(2-2) انواع المستضدات المستعملة ضد داء اللشمانيا :

1 – استعمل الطفيلي الكامل Whole Parasite

2 – استعمل اجزاء البروتين Proteins Fractions ، البروتينات المنقاة او المكلونة Purified or cloned proteins ، الببيتدات peptides

1- الطفيلي الكامل Whole Parasite

ان الطفيلي الكامل يمكن استعماله كلقاح بأسلوبين :

اولا : - اللشمنة Leishmanization

وهي طريقة قديمة تتضمن حقن مواد من قرحة جلدية حادة في الذراع أو الأرداف للأشخاص من الذين لم يتعرضوا لخمج اللشمانيا الجلدية مسبقاً وذلك لتوليد قرحة ذاتية الالتئام في الأماكن المخفية من الجسم , فيما امكن استخدام الطور الامامي السوط Promastigtoes الحي والمنمى في الوسط الزراعي كلقاح في بلدان عدة . واكدت منظمة الصحة العالمية (WHO,1984) على الامور الآتية فيما يخص عملية اللشمنة :-

- كل شخص يجرى تمنيعه بهذه الطريقة يعد حاملاً ومصدراً للمرض طالما لم تندمل الآفة الجلدية .
- ينبغي عدم تمنيع الأشخاص الذين يشتبه في ان لديهم عوزا مناعياً او الذين يتلقون علاجاً كابتاً للمناعة .

ويوصي Ifeoma and Jude (2009) بتطبيق هذه الطريقة حيثما يتعرض الناس بدرجة مفرطة للإصابة بالمرض . وعلى المستوى التجريبي فإن إعطاء حيوانات الهامستر او الفئران جرع صغير من الطور أمامي لطفيلي *L. tropica* عن طريق التجويف الخلبي يؤدي الى توليد حماية ضد خمج لاحق (خمج التحدي) بنفس النوع من اللشمانيا .

وإن الطفيلي المضعف بالاستنبات الزرعي له القدرة على توليد حماية ضد خمج لاحق لنوع الطفيلي حيث استخدم *L. donovani* في الخمج السابق واللاحق . واستخدم التشعيع في تثبيط امراضيه الطفليلي ، وعند استخدام طفيلي *L. major* المضعف بأشعة كاما أعطى حماية جيدة ضد خمج التحدي في الفئران (Nascimento *et al* ., 2004).

ثانيا : اللقاح المقتول Killed Vaccine

ان اول محاولة سريرية للتلقيح ضد داء اللشمانيا الجلدية الأمريكي أجريت من قبل Salles-Gomes (1993) حيث جرب حقن الطور الأمامي السوط المقتول بالفينول ، وقد استخدم مزيج من خمسة عزلات مختلفة مقتولة للطور الأمامي السوط لطفيلي اللشمانيا في محاولة سريرية للتمنيع وقد أعطيت مناعة لمدة ثلاث سنوات مع عدم حدوث أعراض جانبية حادة نتيجة استخدام اللقاح المقتول . البعض يفضل اللقاح المقتول بدلاً من اللقاح الحي بالنسبة لطفيلي اللشمانيا وذلك لاستعمال الطفيلي المقتول في اختبار اللشمانين الجلدي (Leishmanin Skin Test) الذي يعد من الاختبارات التشخيصية المقبولة على مدى عدة عقود .

لقتل الطفيلي إما ان يعرض لحرارة المؤصدة (*Leishmania* Autoclaved Killed) او باستعمال المواد الكيميائية ويمكن استخدام اللشمانيا المقتولة مع لقاح ال BCG كخليط لقاح والذي يمكن عده الجيل الأول من اللقاحات ضد داء اللشمانيا First generation Vaccine (Modabber , 2000).

إن استعمال لقاح الـــ BCG لوحده يكون ذو تأثير وقائي قصير الأمد إذا ما قورن بخليط اللقاح حيث ان لقاح الـ BCG لوحده يمكن ان يولد حماية في الفئران ضد الخمج التجريبي باللشمانيا الجلدية . (Remer *et al* ., 2007)

2- أجزاء البروتينات والبروتينات المنقاة او المكلونة والببتيدات

Proteins fraction , purified or cloned proteins and peptides

هذه اللقاحات تعد من لقاحات الجيل الثاني ضد داء اللشمانيا (Second generation Vaccine) وقد تم معرفة الكثير منها ولكنها تحتاج الى عدة سنوات قبل تجربتها على الإنسان .

وان لقاحات الجيل الثاني يمكن ان تقسم الى عدة اقسام هي :-

1- لقاح اللشمانيا المعاد تشكيلها وراثيا Recombinant Leishmania Vaccine

2- لقاح البكتريا او الفايروس المعاد تشكيلها وراثياً (لقاح الناقل المعاد تشكيله وراثياً)

.Recombinant Bacteria or Virus Vaccine (Recombinant Vector Vaccine)

3- لقاح الجزيئات المعاد تشكيلها وراثياً Recombinant Molecules Vaccine

4- اللقــاحات المجــزئة والببتيــدات المصــنعة Fraction and Synthetic peptides (Russo *et al* ., 2002)

1- لقاح اللشمانيا المعاد تشكيلها وراثيا Recombinant Leishmania Vaccine

ان تطور المعالجات الوراثية والدراسات على مستوى الجزيئي لطفيلي اللشمانيا حققت تقدما عملياً في علاج المرض والوقاية منه وذلك من خلال عملية إزالة الجينات المسؤولة عن فوعة طفيلي اللشمانيا , وقد استعملت هذه الطفيليات في تمنيع الفئران ضد خمج لاحق بطفيلي ممرض .

2- لقاح البكتريا او الفايروس المعاد تشكيلها وراثياً (لقاح الناقل المعاد تشكيله وراثياً)

Recombinant Bacteria or Virus Vaccine (Recombinant Vector Vaccine)

التعبير عن الجينات المشفرة للمستضدات الرئيسية لكائن ممرض معين وذلك بتقديم الجينات عن طريق بكتريا اوفايروس مضعف ، حيث تعمل هذه الكائنات المضعفة كناقل ، حيث يتكاثر الناقل ضمن المضيف ويعبر عن الجين العائد لذلك الكائن الممرض .

مثل هذه اللقاحات جريت على مستوى طفيلي اللشمانيا وذلك بكلونه الجين gp63 الطفيلي L. *major* والتعبير عنه على لقاح الـ BCG بكتريا Mycobacterium bovis المضعفة.

3- لقاح الجزيئات المعاد تشكيلها وراثياً Recombinant Molecules Vaccine

الكثير من جزيئات اللشمانيا المعادة تشكيلها وراثياً قد جربت على الفئران لغرض تمنيعها وقد أظهرت هذه الجزيئات مستويات جيدة من التمنيع .

4- اللقاحات المجزئة والببتيدات المصنعة Fraction and Synthetic peptides

والتي تشمل المستضدات اللشمانية الآتية :

***Lipophosphoglycan (LPG)**

لهذا المستضد تأثير ممنع عند استعماله كلقاح في الفئران (Gerald *et al* ., 2000)

******Leishmania major* **surface protease (Glycoprotein gp63)**

يمكن استعمال هذا المستضد في تمنيع الفئران ضد خمج التحدي بطفيلي *Leishmania major* وهناك إمكانية استخدام كلا المستضدين كلقاح ضد خمج طفيلي *Leishmania mexicana* . (Alexander *et al* ., 1995)

*** Kda *Leishmania donovani* protein 72 (dp 72)**

اظهرت نتائج تمنيع الفئران بهذا المستضد اختزال في مستوى عدد الطفيليات في الكبد (Parasitemia in Liver) بنسبة 81% إذا ما قورنت بحيوانات السيطرة.

******Leishmania Mexicana* **a46 Da surface Membrance**

***Glyckoprotein (GP46 M2)**

ان لهذا البروتين أهمية في انتاج لقاح ضد داء اللشمانيا بصورة عامة.

The Promastigote surface Antigen2 (PSA-2) complex of *L. major

بين (1991)., Jardim *et al* من خلال النتائج التي حصل عليها على امكانية تمنيع الفئران بهذا المستضد ضد الخمج لاحق بطفيلي *L. major* وإمكانية استعمال هذا المستضد كلقاح ضد داء اللشمانيا الجلدي في المستقبل .

هناك مستضدات اخرى مثل gp 10/20 والتي تؤدي الى تفاقم القرح الجلدية (Dillom and Lane, 1999). بالإضافة الى العديد من التجارب التي اجريت على الفئران باستخدام مستخلصات الطفيلي او الطفيلي المجزء. جدول (2-2)

جدول (2-2): يبين بعض لقاحات الجيل الثاني ضد داء اللشمانيا (Dillom and Lane, 1999)

نوع اللقاح	وصفه	امثلة
لقاح اللشمانيا المعاد تشكيله وراثيا	طفيلي اللشمانيا الحي وقد ازيلت منه الجينات (المورثات) المسؤولة عن الفوعة .	Recombinant Leishmania (DHFR/TS)
لقاح البكتريا والفايروس المعاد تشكيله وراثياً (لقاح الناقل المعاد تشكيله وراثياً)	هي كلونة جين (مورث) مسؤول عن التشفير لمستضدات اللشمانيا والتعبير عنها بأستخدام ناقل كأن يكون فايروس او بكتريا	*Salmonella*-gp63
		BCG-gp63
		Vaccinia-gp46
لقاح الجزيئات المعاد تشكيلها وراثياً	جزيئات من طفيلي اللشمانيا وقد تم اعادة تشكيلها وراثياً	*Leishmania donovani* dp72
		Leishmania major gp63
اللقاحات المجزأة والببتيدات المصنعة	مستضدات من طفيلي اللشمانيا معزولة ومنقاة	Lipophosphoglycan (LPG)

2-15-2 العوامل المؤثرة على انتاج اللقاحات ضد داء اللشمانيا

لوحظ ان لكل من طبيعة مستضد اللشمانيا المستخدمة في التمنيع له علاقة بالحصول على استجابة مناعية جيدة إضافة الى العامل المساعد المستخدم وطريقة إعطاء اللقاح ونوع المضيف المستخدم . Rivier *et al*.,1999))

1- طبيعة مستضد اللشمانيا *Leishmania* antigen

ان طبيعة المستضد المستخدم كلقاح له دور مهم في تطوير الاستجابة المناعية لذلك يجب ملاحظة نوع المستضد المستعمل في التمنيع فعلى سبيل المثال ان اللشمانيا المقتولة لا تعطي مستوى التمنيع نفسه كما في اللشمانيا الحية. كما ان الطفيلي في طور الثبوت (Stationary Phase) اكثر فوعة واكثر تمنيعا من الطور اللوغارتمي للنمو (Sacks,1989) .

2- طبيعة العامل المساعد المستخدم (Adjuvant)

ان اختيار العامل المساعد المستخدم مع اللقاحات ضد داء اللشمانيا يمكن ان يكون سبباً مهما في نجاح هذه اللقاحات لأنها تساعد في تحفيز استجابة مناعة للمضيف الممنع , حيث ان استعمال اللقاحات دون مساعد قد لا يعطي حماية جيدة . وان اضافة المساعدات الى اللقاحات تؤدي الى اطالة التأثير الممنع لهذه اللقاحات من خلال تحفيز مستويات عالية من الخلايا التائية المساعدة والخلايا القاتلة الطبيعية والبلعمية .ومن المساعدات التي استعملت مع اللقاحات ضد داء اللشمانيا هو لقاح الـــ BCG Mycobacterium bovis وبكتريا *Corynebacterium paravum* (الورد ،2001) .

3- الطرق المستعملة في التمنيع

ان طريقة استخدام اللقاح تعد عامل مؤثر على الاستجابة المناعية ضد هذه اللقاحات حيث ان التمنيع تحت الجلد يؤدي الى عدم إعطاء حماية ضد الخمج باللشمانيا الجلدية وعند حقن الطور الأمامي السوط المشع في الوريد او التجويف الخلبي للفئران يعطي حماية جيدة .ان التمنيع تحت الجلد باستعمال الطور الامامي السوط المشع حقق حماية ضد خمج لاحق بطفيلي *Leishmania* اما التمنيع داخل الأدمة فقد حقق وقاية جيدة ضد المرض في حيوانات الهامستر الذهبي ، الجرذ الأفريقي الذنب (Tailed rat white) وفي الكلاب(التميمي ،1990). اما في الانسان فان التمنيع تحت الجلد او داخل الأدمة هي الطرق الوحيدة المستعملة او الممكنة .

4- الخلفية الوراثية للمضيف المستخدم

ان تقدم الخمج بطفيلي اللشمانيا يعتمد على الخلفية الوراثية للمضيف وعلاقتها بتطور الخلايا التائية الى ان المقاومة ضد الخمج طفيلي*Leishmania major* يسيطر عليها بواسطة جين مفرد وان الكثير من سلالات الفئران تظهر اشكالا مختلفة من الخمج فالضرب Balb /c من الفئران غير قادرة على السيطرة على المرض على العكس من الضرب C57 الذي يظهر مقاومة اكثر للخمج .

اما بالنسبة لحيوان الهامستر الذهبي فهو اكثر حساسية للخمج باللشمانيا مقارنة مع الجرذ الاسود والفأر الابيض وفأر المنزل (الشنوي ، 1975) وان الخمج باللشمانيا الجلدية المخاطية في الانسان غالبا ما يقتصر على الزنوج .

2-15-3 المعايير المستخدمة في تحديد فعالية اللقاح

ان الاستجابة المناعية المتولدة عن استخدام اللشمانيا المقتولة كلقاح مع الـ BCG او بدونه يمكن ان يتوضح بواسطة استخدام عدد من الطرائق المناعية مثل اختبار فرط الحساسية المتأخر وبقياس قابلية الخلايا اللمفاوية على التحول والانقسام وانتاج انترفيرون نوع كاما لكل من المستضدات المستخدمة كلقاح ولكون هذه المستضدات يمكن ان تحفز واحدا من هذه المعايير على الاقل والتي تستخدم في قياس الاستجابة المناعية الخلوية.

ان الشفاء المحفز من قبل العلاج او الشفاء الذاتي للخمج بطفيلي اللشمانيا يرتبط مع هذه المعايير ، اما بالنسبة لقياس نسبة الأضداد المتكونة فهو دليل على فعالية الخلايا اللمفاوية البائية وعلى طول مدى تأثير المستضد في المضيف على الرغم من ان مستوى الأضداد لا يرتبط مع الحماية ضد المرض ، وفي الحيوانات المختبرية يمكن استخدام معيار آخر لتحديد فعالية اللقاح وهو الاستجابة لفحص التحدي الذي يتبع التلقيح (Remer *et al* ., 2007) .

2-16 اللقاحات ضد داء اللشمانيا في العراق

تشير بعض المصادر الى ان المحاولات الاولى للتمنيع ضد اللشمانيا في العراق حدثت في بعض مناطق بغداد تحديدا حيث كان بعض الناس يقومون بتعريض الاجزاء السفلية من اجساد اطفالهم الى وخزة الحشرة الناقة للمرض (ذبابة الرمل) لكي يمنعوا عنهم اصابة لاحقة في الوجه وهذا لا يعني ان الناس في اجزاء اخرى من العراق لم يقوموا بهذه العملية الوقائية البسيطة اسوة بباقي شعوب المناطق المتوطنة بالمرض .

جرت بعض المحاولات في العراق للتمنيع ضد المرض بشكليه (الجلدي والاحشائي) في الحيوانات المختبرية وان اكثر هذه الحيوانات استخداما هو الهامستر الذهبي كونه اكثر حساسية للخمج باللشمانيا مقارنة مع الجرذ الاسود والفأر الابيض وفأر المنزل . هذه المحاولات المختلفة اقتصرت على الحيوانات المختبرية ولم تصل الى البشر ، ولم يتعد كونها لقاحات من الجيل الاول (مقتولة او مضعفة بالاستنماء الزرعي او بالاشعاع) ، الا ان هناك بعض المحاولات التي جرت لتجربة بعض لقاحات الجيل الثاني على الحيوانات المختبرية (التميمي ، 1990 ؛ المرسومي ،1995 ؛ الورد ،2001 ؛ النجار ، 2002) .

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل Materials and Methods

1-3 المواد

1-1-3 الاجهزة المختبرية المستعملة: استعملت عدد من الأجهزة والمستلزمات في الدراسة، جدول رقم (3-1)

جدول (3-1) يوضح الأجهزة والمستلزمات المختبرية المستعملة في الدراسة

ت	اسم الجهاز		الشركة المصنعة والمنشأ
1	الكابينة المعقمة	Laminar flow cabinet	Jeiotech (Korea)
2	حاضنة هزازة	Shaker incubator	(Thelco)
3	حاضنة مبردة	Cooling incubator	(Thelco)
4	حمام مائي	Water bath	Labtech (Korea)
5	جهاز النبذ المركزي	Centrifuge	Hereaus (Germany)
6	جهاز النبذ المركزي المبرد	Cooling Centrifuge	Hettich (Germany)
7	ميزان الكتروني حساس	Electrical sensitive balance	Sartorius(Germany)
8	محراك مغناطيسي	Magnetic stirrer	Labtech (Korea)
9	جهاز تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل	Thermal cycler DAN incubator	Cleaver scientific (USA)
10	جهاز الترحيل الكهربائي	Gel electrophoresis apparatus	Cleaver scientific (USA)
11	جهاز التوثيق الفوتوغرافي	Photo documentation system	Cleaver scientific (USA)
12	مازج	Vortex	Dubuque (USA)

13	ماصات أوتوماتيكية	Automatic Micropipettes	Bio Basic (Canada)
14	أنابيب مانعة للتخثر EDTA	EDTA coated tube	AFMA (Jordan)
16	زجاجيات مختلفة	Pyrex	Volac (England)
17	محقنه طبية	Medical Syringe	Jordan
18	أنابيب ابندروف	Eppendrofs tubes	China
19	خراطيش	Pipets tips	China
20	مجهر ضوئي	Olympus	Japan
21	شريط شمعي	Para-Film	Elphor -Germany
22	منظومة الاليزا	ELISA	Biotteck Washer ELX-50 , Rwedeer ELX-800 (U.S.A)

2-1-3 المواد الكيميائية Chemical materials

المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة موضحة في الجدول (3-2)

جدول (3-2) يوضح المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة

ت	اسم المادة الكيميائية		الشركة المصنعة والمنشأ
1	عدة استخلاص DNA	Wizard Genomic DNA Purification A1120) Kits (cat.	Geneaid (Korea)
2	أكاروز	Agarose	BIO BASIC (Canada)
3	محلول دارئ منظم	10X TBE Buffer Solution	BIO BASIC (Canada)
4	معلمات الحجم	DNA ladder Marker(100-2000 bp)	Bioneer (Korea)
5	صبغة برومو فينول الزرقاء	Bromo phenol blue	Bioneer (Korea)
6	بوادئ	Primers	Bioneer (Korea)
7	ماستر مكس	PCR PreMix	Bioneer (Korea)
8	بروميد الاثيديوم	Ethidium Bromide	BIO BASIC (Canada)
9	أيزوبروبانول	Isopropanol	BIO BASIC (Canada)
10	كحول مثيلي مطلق	Absolute Methanol	Scharlau (Spain)

11	دم فصيلة AB^{-} ve	AB-ve plasma	blood bank (Karbala)
12	مصل العجل البقري	Fetal calf serum	-Euroline Europa
13	العدة التشخيصية للغلوبيولين المناعي IgG kit	Immunoglobulin kit IgG	BIOSORURCE Europe S.A.
14	العدة التشخيصية للغلوبيولين المناعي IgM kit	Immunoglobulin kit IgM	BIOSORURCE Europe S.A.
15	العدة التشخيصية للحركي الخلوي IFN- γ kit	Cytokine kit IFN- γ	BIOSORURCE Europe S.A.
16	العدة التشخيصية للحركي الخلوي IL-10 kit	Cytokine kit IL-10	BIOSORURCE Europe S.A.

2-3 طرائق العمل Methods

3-2-1 جمع العينات من المرضى المصابين

شملت دراسة 225 شخصا مصابا بداء اللشمانيا الجلدية Cutaneous Leishmaniasis بعد تشخيصها من قبل أطباء الاختصاص في الامراض الجلدية في مستشفيات المحافظات (مستشفى الكرامة و مستشفى الصدر التعليمي في محافظة بغداد ، مستشفى الحلة التعليمي ، مستشفى الحسين التعليمي ومستشفى عين التمر العام في كربلاء المقدسة، مستشفى الصدر في محافظة النجف الاشرف ، مستشفى الكرامة ومستشفى الزهراء التعليمي في محافظة واسط ، مستشفى الديوانية التعليمي ، مستشفى الحسين التعليمي العام في ذي قار ، مستشفى السماوة العام ، مستشفى الصدر العام في ميسان ، مستشفى الصدر التعليمي ومستشفى القرنة العام في محافظة البصرة) وللفترة من شهر تشرين الاول 2011 الى شهر آذار 2013 . وضعت العينات المسحوبة من قرحة المريض في انابيب الأوساط الزرعية المحضرة وحضنت في مختبرات المستشفيات المذكورة أعلاه بدرجة حرارة 26م° وهي الدرجة الملائمة لنمو الطور المسوط لحين نقلها الى مختبر كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة كربلاء لاجراء استخلاص DNA . دونت المعلومات الكاملة من قبل المرضى باستمارة استبيان خاصة بهذا بمرض اللشمانيا الجلدية (شكل 3-1) .

شكل (3-1): استمارة استبيان خاصة بالمصابين بمرض اللشمانيا الجلدية

اسم المريض الثلاثي :			
العمر :			
الجنس :	ذكر	انثى	
منطقة السكن :			
هل توجد حديقة في المنزل أو مزارع بالقرب منه :			
تاريخ ظهور القرحة :			
نوع القرحة :	جافة	رطبة	
قطر القرحة بالسنتمتر :			
انتشار القرحة في مناطق الجسم :			
هل توجد أكثر من إصابة :			
هل توجد إصابة سابقة :		تاريخها	

3-3 الأوساط الزرعية والمحاليل المستعملة Media & Solutions

3-3-1 الوسط ثنائي الطور Biphasic Medium

يسمى أيضا NNN Medium (Novy, MacNeal-Nicolle) ويتضمن طوران سائل وصلب ، أستعمل لتنمية وإدامة طفيلي اللشمانيا أمامي السوط Promastigote (Kagan & Norman,1970) .

a – الطور الصلب Solid Phase

جدول (3-3) مكونات الوسط ثنائي الطور NNN Medium الطور الصلب Solid Phase في اللتر الواحد

نقيع الدماغ والقلب	Brain-Heart infusion	37 غم
دكستروز	Dextros	10 غم
أكار	Agar	20 غم
ماء مقطر	Distilled Water	1000 مل
دم فصيلة AB-ve بدلا من دم الارنب الخالي من الفايبرين Defibrinated rabbit blood (تعديل من قبل مركز ابحاث جامعة النهرين)		100 مل
مضاد حيوي (جنتامايسين)	80 ملغم / مل Gentamycin	1.25 مل

تحضير الوسط :

خلطت المواد المذكورة أعلاه (عدا المضاد الحيوي والدم) و عدلت قيمة الدالة الحامضية (pH) إلى 7.4±0.1 وعقمت بالمؤصدة Autoclave بدرجة 121مº تحت ضغط واحد جو ولمدة 15 دقيقة ثم تم تبريده بعد اخراجه من المؤصدة في حمام مائي بدرجة 55 مº. أضيف الدم والمضاد الحيوي تحت ظروف معقمة بعدها رج الوسط ثم وزع في قنان زجاجية معقمة لولبية السدادات Screw -cap vials، ثم صب الوسط بشكل مائل للحصول على مساحة سطحية اكبر لنمو الطفيلي، وللتأكد من خلو الوسط من التلوث وضعت القناني في حاضنة بدرجة حرارة 37 مº إلى اليوم التالي(Kagan & Norman,1970).

b – الطور السائل Liquid Phase محلول اللوك

جدول (3-4) مكونات الوسط ثنائي الطور – الطور السائل Liquid Phase في اللتر الواحد

كلوريد الصوديوم	Sodium Chloride (NaCl)	9 غم
كلوريد البوتاسيوم	Potassium Chloride (KCl)	0.42 غم
كلوريد الكالسيوم المائي	Calcium Chloride ($CaCl_2 .2H_2o$)	0.32 غم
بيكاربونات الصوديوم	Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)	0.2 غم
كلوكوز- D	D. Glucose	2 غم
ماء مقطر	Distilled Water	1000 مل
مضاد حياتي (جنتامايسين) 80 ملغم/مل	Gentamycin	1.25 مل

تحضير الوسط :

اذيبت المواد التي سبق ذكرها في الماء المقطر عدا المضادات الحياتية وعدل الأس الهيدروجيني إلى (7.4±0.1)، وجرى تعقيم الوسط وتبريده كما في الوسط السابق ثم أضيف المضاد الحياتي اليه ووزع في قنان صغيرة معقمة سعة (25) مل .

أضيف نحو(0.5-1) مل من الطور السائل إلى القنينة الحاوية الطور الصلب وبذلك يتكون الوسط الثنائي الطور ، ثم حضنت القناني بدرجة 37 م° لمدة يوم واحد للتأكد من خلوه من التلوث ثم حفظت القناني في الثلاجة بدرجة 4 م° لحين الاستعمال (Dawson,*et al.*,1969) .

3-3-2 الوسط الزرعي الهلامي Semi-Solid Medium

حضر الوسط الزرعي حسب طريقة Adler & Theodor (1930) واستعمل لعزل الطفيليات من الإنسان واسترجاعها من الأنسجة الحيوانية المصابة ولإدامة الطور أمامي السوط Promastigote بعد استرجاعه في المختبر . وتتكون من المواد الاتية في اللتر الواحد .

جدول (3-5): مكونات الوسط الزرعي شبه الصلب Semi – Solid Medium في اللتر الواحد

كلوريد الصوديوم Sodium Chloride (NaCL)	6.91 غم
كلوريد البوتاسيوم Potassium Chloride (KCL)	0.29 غم
كلوريد الكالسيوم المائي Calcium Chloride ($CaCl_2 .2H_2O$)	0.22 غم
بيكاربونات الصوديوم Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)	0.1 غم
د. كلوكوز D. glucose	0.77 غم
اكار Agar	4غم
ببتون Peptone	1 غم
خلاصة لحم البقر Beef Extract	0.3 غم
ماء مقطر Distilled Water	800 مل
المضاد الحياتي 80 ملغم / 1مل Gentamycin	2.5 مل
دم فصيلة AB-ve بدلا من دم الارنب الخالي من الفايبرين Defibrinated Rabbit Blood (تعديل من قبل مركز ابحاث جامعة النهرين)	200 مل

أكمل الحجم بالماء المقطر إلى 1000 مل

تحضير الوسط :

أذيبت المواد المشار اليها أنفا في الماء المقطر عدا (المضادات الحياتية والدم) وعدل الأس الهيدروجيني إلى (7.4±0.1) لكونه المدى الأمثل لنمو الطفيليات (Al-Hussayni *et al.*, 1987) ثم عقم المحلول بالمؤصدة Autoclave بدرجة حرارة 121مº وضغط واحد جو لمدة 15 دقيقة ثم وضع الوسط في حمام مائي بدرجة 55مº لغرض التبريد ثم أضيف كل من المضادات الحياتية والدم ومزج المحلول جيداً ووزع في قنان زجاجية معقمة سعتها 25مل، وضع في كل منها نحو4 مل من الوسط ثم حضنت القناني بدرجة حرارة 37 مº ولمدة 24 ساعة للتأكد من خلوها من التلوث ثم وضعت في الثلاجة بدرجة 4 مº لحين الاستعمال .

3-3-3 تحضير الوسط الزرعي

RPM I -1640 (Roswell park medium institute)

RPMI-1640 with hepes buffer, L-glutamin	10.4 غرام
Sodium bicarbonat (4.4%) بيكاربونات الصوديوم لتعديل الأس الهيدروجيني إلى 7.2	15 مليلتر
Crystalline penicillin	0.5 مليلتر
Streptomycin	0.5 مليلتر
Bovin calf serum	100 مليلتر

أكمل الحجم بالماء المقطر إلى 1000 مل بإضافة الماء المقطر ، ثم عقم بمرشح ذو ثقوب بقطر (0.22) مايكرون .

*** محلول PBS Phoshate Buffer Saline solution**

هو عبارة عن محلول فسلجي يتألف من مزيج من بعض الاملاح المذابة في الماء حيث يـتم ضبط الدالة الحامضية لهذا المحلول على (7.4) ومكوناته في اللتر هي :

المكونات	المقادير (لكل لتر)
NaCl	8 gm
KH_2PO_4	0.2 gm
$Na_2HO_4. 12H_2O$	2.89 gm
KCl	0.2 gm
H_2O	1000 ml

4-3 عزل طفيليات اللشمانيا

جرى عزل طفيليات اللشمانيا الجلدية من الآفة الجلدية بعد قيام الطبيب المختص بتشخيصها على طريقة الالوسي ، (1979) و AL-Husheimi (2005) اذ نظفت منطقة البشرة جيدا بالكحول الاثيلي بتركيز 70% ثم تركت لتجف ، وغـرزت حقنـة نبيذة سعـة واحد مل تحـتوي على 0.1-0.2 مل من محلول ملحي معقم (sterile saline) تحت الجلد في الحافة الوردية للبشرة المحيطة بالقرحة. تم تدوير الابرة 2-3 مرات اثناء وجودها في الجلد حيث تقطع قطع صغيرة من الأنسجة من حافة الجرح للإبرة. ويسحب بعدها مباشرة ، زرع السائل المسحوب في قنينتين بحجم (25) مل حاوية اربع مل من الوسط الزرعي الهلامي (Semi-Solid Medium)، وحفظت القناني بدرجة حرارة (26) مº (الدرجة الملائمة لنمو الطور المسوط) في مختبر الطفيليات . وبعد 24 ساعة من العزل فحصت قطرة من الوسط للتأكد من خلوها من التلوث، وبعد مرور (5-6) يوم وعند رؤية الاطوار المسوطة promastigotes ينقل (0.5) مل من الحالة الموجبة من الوسط الزرعي الهلامي إلى أوساط زرعية ثانوية sub culture من الوسط الثنائي الطور (NNN) والوسط الزرعي RPMI وحضنت بدرجة (26) م . وفي حالة عـدم ظـــهور الطـور أمامـي السـوط Promastigote في المزارع يتـم التخلص مـن العـزلة وتعـد ســالبة (Noyes *et al*., 1998; Hatam *et al*., 1997; Ershadi and Javadion, 1996).

في أثناء عزل طفيلي اللشمانيا الجلدية وبعد سحب الحقنة أخذت قطرة دم من منطقة الغرز على شريحة زجاجية نظيفة وعملت مسحة ثبتت بالكحول الاثيلي بتركيز 95% وصبغت بصبغة كمزا للتأكد من وجود الطور عديم السوط Amastigote لطفيليات اللشمانيا (Noyes *et al*., 1998; Adini *et al*.,1998; WHO,1998) .

5-3 الصبغ Staining

استعملت صبغة الكمزا Giemsa stain لصبغ أمامية السوط وذلك بحسب طريقة Manson-Bahar (1987) ، حيث تعد هذه الصبغة من الصبغات سهلة التحضير وتتكون من :

1- (3.8) غم من مسحوق صبغة الكمزا.

2- (250) سم3 من الكليسيرول.

3- (250) سم3 من كحول الميثانول.

حيث تمزج المواد في قنينة مناسبة وترج بقوة ثم تحضن بدرجة (37)°م لمدة (24) ساعة بعدها توضع الصبغة في حاضنة هزازة Shaker incubator عدة ساعات لتصبح جاهزة للاستعمال ويفضل ترشيحها قبل الاستخدام .

6-3 طريقة الصبغ Method of staining

1- تعد مسحة رقيقة من الطفيليات وذلك بوضع قطرة صغيرة من محلول لوك الحاوي على الطفيليات قرب حافة شريحة زجاجية نظيفة وفرشها باستخدام حافة شريحة زجاجية اخرى ثم تترك لتجف.

2- تثبت المسحة بوضع بضع قطرات من كحول الميثانول عليها لمدة دقيقة واحدة.

3- تخفف الصبغة بالمحلول المنظم PBS وبواقع 15% وتوضع في الوعاء المخصص للصبغ (الجار) ثم تغمر الشريحة الزجاجية فيه وتترك لمدة 15 دقيقة.

4- ترفع الشريحة وتغسل بالمحلول المنظم او بماء الحنفية.

5- تترك الشريحة لتجف ثم تفحص تحت المجهر باستخدام العدسة الزيتية.

3-7 الدراسة الجزيئية Molecular Study

1-7-3 استخلاص الـ DNA

تم استخلاص الحامض النووي الـ DNA من عينات الطفيلي للعينات المشمولة بالدراسة لغرض أجراء الفحص الجزيئي للجينات المشمولة بالدراسة .

- **مكونات عدة استخلاص إلـــ DNA Isolation Kit Components**

Components المكونات	Amount/ml الكمية
1- محلول تحليل خلايا(RBC) RBC lysis Solution	(360 ml)
2- محلول تحليل Cell lysis Solution	(100ml)
3- محلول ترسيب البروتين Protein Removal Buffer	(40 ml)

- **طريقة استخلاص الـDNA DNA Isolation Protocol**

تم استخلاص الـ DNA حسب تعليمات العدة (Kit) لشركة Geneaid وبإضافة خطوة اضافية لتكسير للغشاء الخارجي لطفيلي اللشمانيا .

1- اضافة Proteinase K الى العينة 20 مايكروليتر وذلك لتكسير الغشاء الخارجي للطفيلي ، ونبذت مركزيا (3000x g) دورة/ دقيقة لمدة 5 دقائق
2- أضيف 300 مايكروليتر من الوسط الزرعي الحاوي على طفيليات مركزة إلى ابندروف حجم 1.5 ملم ثم أضيف لها 900 مايكروليتر من محلول RBC lysis Buffer ومزج الخليط بلطف وترك بدرجة حرارة الغرفة لمدة خمس دقائق لتحليل خلايا الدم.
3- نبذت بعدها الأنابيب بسرعة (3000x g) دورة/ دقيقة لمدة خمس دقائق.
4- أهمل الرائق بلطف من دون أتلاف الطبقة البيضاء مع بقاء حوالي 50 مايكروليتر من المتبقي لغرض مزج طبقة الخلايا البيضاء بواسطة جهاز المازج Vortex.
5- أضيف 300 مايكروليتر من محلول Cell lysis Buffer ومزجت المحتويات بجهاز Vortex ثم حضنت الأنابيب بالحاضنة لمدة عشرة دقائق بدرجة حرارة 60 م^{o} مع رج الأنابيب ثلاث مرات كل ثلاثة دقائق
6- أضيف 100 مايكروليتر من Protein Removal Buffer إلى الأنابيب ومزجت بلطف بالمازج ثم وضعت في الثلج لمدة خمس دقائق.
7- نبذت الأنابيب لمدة ثلاثة دقائق بسرعة 15000 g x.
8- نقل الرائق إلى أنابيب جديدة وأهمل الراسب وأضيف له 300 مايكروليتر من الايزوبروبانول Isopropanol ثم مزج الخليط بلطف لمشاهدة خيوط الـ DNA.
9- نبذت الأنابيب لمدة خمس دقائق.
10- أهمل الايزوبروبانول بلطف Isopropanol وأضيف 300 مايكروليتر من الايثانول Ethanol 70% إلى إل DNA المتمركز على جدران الأنبوبة ثم رجت الأنابيب لغسل الـ DNA.
11- نبذت الأنابيب لمدة ثلاثة دقائق بسرعة 15000 g x.
12- تم إزالة الايزوبروبانول Isopropanol بلطف بقلب الأنابيب على ورقة ترشيح ثم يضاف لها 300 مايكروليتر ايثانول 70%

13- تم إزالة الايثانول Ethanol بلطف ثم قلبت الأنابيب على ورق نشاف لتجفيفها لمدة عشرة دقائق.

14- أضيف محلول (TE) Trice EDTA 100 مايكروليتر ثم حضنت الأنابيب في حمام مائي بدرجة حرارة 60 م^{o} لمدة ساعة مع الرج لإذابة الـ DNA.

15- حفظت الأنابيب بدرجة حرارة (20^{o}-) لحين الاستعمال.

2-7-3 ترحيل الـــ DNA Agarose Gel Electrophoresis

بعد استخلاص الـ DNA اعتمدت طريقة (Sambrook *et al.*, 1990) للتأكد من وجود إلـ DNA المستخلص .

- **مواد الترحيل الكهربائي Reagents of Gel Electrophoresis**

1- أكاروز Agarose

2- محلول بفر المنظم 10 X TBE buffer solution

3- صبغة برومو فينول الزرقاء Bromophenol Blue

4- بروميد الاثديوم Ethidium Bromide

5- معلمات الحجم DNA ladder Marker (100- 2000 bp) و (100- 1000 bp)

- **خطوات الترحيل الكهربائي Protocol of Gel Electrophoresis**

****تحضير هلام الأكاروز**

1- تم إذابة 0.8غم من الأكاروز في 100 مل من 1 X TBE بواسطة تسخين المزيج إلى درجة الغليان باستخدام الحمام المائي إلى أن تم إذابة كل دقائق الجل إذ يبدو المزيج صافي من دون أي دقائق عالقة من المسحوق .

2- تم إضافة 2 مايكروليتر من بروميد ألاثيديوم Ethidium Bromide إلى سائل الأكاروز

3- حرك سائل الأكاروز لكي يمتزج ولتجنب حدوث فقاعات

4- صب المزيج في صفيحة ألإسناد وبعد غمس المشط comb قرب أحدى نهايتي الصفيحة

5- ترك المزيج ليتصلب في درجة حرارة الغرفة.

6- تم إزالة المشط بهدوء وكذلك مساند الصفيحة.

7- وضعت الصفيحة في مسندها في وحدة الترحيل الكهربائي ثم غطيت ببفر الترحيل 1X TBE إذ تم تغطية الهلام .

**** تحميل إلـ DNA والترحيل الكهربائي DNA loading & Electrophoresis**

مزج 10 مايكروليتر من الـ DNA مع 3 مايكروليتر من loading dye (صبغة البروموفينول الزرقاء Bromophenol Blue) إذ حملت العينات في الحفر المفردة من الجل. تم ترحيل العينات على طاقة كهربائية مقدارها 70 فولت ولمدة ساعة، إذ تم الترحيل من الكاثود (-) إلى ألانود (+)، ثم تم استخدام جهاز مطياف الأشعة فوق البنفسجية UV light transillminator لغرض مشاهدة حزم الـ DNA، وان الحزم الملونة بصبغة بروميد الاثيديوم ethidium bromide fluorescence صورت باستخدام جهاز التصوير الفوتوغرافي Photo documentation system.

3-7-3 التوصيف الجزيئي للجينات المدروسة

أ- اختيار البوادئ

تم اختيار البوادئ Primers لغـرض أجـراء الكشف الجزيئي للـ *Leishmania* kDNA لانواع الطفيليات بتسلسل معين من القواعد النايتروجينية حيث تم تصميم منطقة ITS (وهي منطقة للتغاير الجيني بين انواع اللشمانيا تبعا للانزيمات القاطعة الهاضمة). (Elahe *et al* ., 2013) و(Mhdavami *et al* .,2011)

CSB1xF (CGAGTAGCAGAAACTCCCGTTCA)

وCSB1xR (ATTTTTCGCGATTTTCGCAGAACG)

ب - تخفيف البادئات Primers Dilution

جُهزت البادئات جميـعها من شـــركة Bioneer Company/ Korea كمسحوق مجفف Lyophilized product ، تم تحضير محلول الخزين Stock solution ومحـلول العمل Working solution بحسب تعليمات شركة Bioneer. حُضر محلول الخزين وذلك بإضافة الماء المزال الأيون Deionized water للحصول على التركيز النهائي للعالق 100مايكروليتر/ بيكومول . أما محلول العمل Working solution فقد تم تحضيره بواسطة سحب 10 مايكروليتر من محـلول الخزين 100مايكروليتر/ بيكومول وتخفيفه بـ 90 مايكروليتر من الماء المزال الأيون للحصول على التركيز النهائي لمحلول العمل والذي هو (10مايكروليتر/ بيكومول).

4-7-3 تفاعل أنزيم البلمره المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR)

يوضح الجدول رقم (3-6) المواد المستخدمة في الكشف الجزيئي باستخدام تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل للعينات المدروسة .

جدول (3-6) المواد المستخدمة في تفاعل أنزيم البلمره المتسلسل

PCR master mix reaction		**Volume**
PCR premix		5 µL
Primers	**F**	1 µL (10 picomol/ µL)
	R	1 µL (10 picomol/ µL)
Template DNA		2 µL
PCR water		11 µL
Total		20 µL

بعد ذلك تم مزج المواد أعلاه بواسطة جهاز المازج vortex ثم نُقلت ألأنابيب إلى جهاز الـــPCR.

5-7-3 البرنامج المستخدم في الدراسة الجزيئية

الجدول الاتي يمثل البرنامج المستخدم في الكشف الجزيئي باستعمال تقنية **(PCR)**

جدول (3-7): البرنامج المستخدم للدراسة الجزيئية لأنواع الطفيليات

(Karadeniz *et al*., 2007)

No.	Steps	Temperature	Time	No. of cycles
1	Initial Denaturation	94C°	2min.	1
2	Denaturation	94C°	30 sec.	33
3	Annealing	55C°	30 sec.	
4	Extension	72C°	80 sec	
5	Final Extension	72C°	5 min	1
6	Final hold	4	-	

3-7-6 تحميل ناتج تفاعل البلمرة المتسلسل والترحيل الكهربائي

Loading of PCR product and Electrophoresis

تم تحميل 3 مايكروليتر من الـ DNA ladder مع 10 مايكروليتر من نواتج PCR في جل الأكاروز وبتركيز 2% (1X TBE Buffer) إذ تم الترحيل بفرق جهد مقداره 70 فولت/سم وبتيار 40 ملي فولت ولمدة ساعة ونصف صُبغ الجل بصبغة بروميد ألاثيديوم السائلة وبكمية 2 مايكروليتر تم مشاهدة الحزم بواسطة UV transiluminater، وتم تصويرها باستعمال جهاز التصوير الفوتوغرافي Photo documentation system. حيث الحزمة بطول 560 bp تعود للنوع *L.major* والحزمة 750 bp تعود للنوع *L.tropica* . (Elahe *et al* ., 2013) و(Mhdavami *et al* .,2011)

3-8 الدراسة المناعية للمرضى المصابين في محافظة كربلاء المقدسة

سحب كمية كافية من دم كل شخص مصاب من المراجعين الى مستشفى المحافظة (محافظة كربلاء المقدسة) والبالغ عددهم 125 عينة الذين تمت متابعتهم خلال فترات العلاج ووضعت في اوعية مضادة للتخثر وانابيب EDTA tube وذلك لغرض دراسة الاستجابة المناعية الخلوية والخلطية humeral and cell-mediated immunity ، وفصل الدم للحصول على المصل بجهاز الطرد المركزي ، وقسم المصل المفصول الى اجزاء لتفادي تكرار التجميد والذوبان

وخزنت في درجة حرارة −20 °C لحين الاستعمال .لتعيين قيم IgG ، IgM والسايتوكينات γ IFN- ، IL-10 .

تم تقدير هذه المعايير بتقنية الاليزا ELISA ، للتقدير الكمي المناعي الدقيق (المعايرة الدقيقة) Microtiterplate إذ تستخدم الأجسام المضادة وحيدة النسيلة مباشرة ضد محددة مستضدية معينة ، ترتبط العينات مع الأجسام المضادة المغلفة لسطح الحفر Wells إذ تحتوي الصفيحة على 96 حفرة Wells كل منها مغطى بالمستضد النوعي Specific antigen المرتبط بالسطح الصلد (Solid phase) للجدار الداخلي، هذا الاختبار يعتمد على مبدأ عمل إضافة النموذج Sample المراد تحديد وجود الضد النوعي سيؤدي إلى التصاقه بالجدار الداخلي ، بعدها تغسل الحفر باستخدام محلول الغسل Working wash solution الذي سيؤدي إلى إزالة الجزء غير المرتبط من النموذج أما إضافة محلول الارتباط conjugate solution سيؤدي إلى ارتباط النموذج مناعيا مع تلك العوامل مكون ما يسمى معقد الشطيرة Sandwich complex . بعد فترة الحضن ،غسلت الحفر مجددا لإزالة محلول الارتباط غير المقترن تتبعها خطوة إضافة المادة الأساس Substrate إلى الحفر والتي تؤدي بتفاعلها مع محلول الارتباط إلى ظهور كاشف لوني والذي يظهر بعد الإضافة والحضن . اوقف التفاعل بإضافة محلول التوقف Stop solution إذ يؤدي هذا المحلول إلى إيقاف التفاعل وتغيير اللون . بعدها قيس على الطول الموجي (450 - 460) نانوميتر ، حيث تتناسب شدة اللون الظاهر طرديا مع كمية العامل المراد قياس تركيزه .

تحضيرالكواشف reagents preparation:

1- المحلول القياسي Standard :حضر بإضافة المحلول القياسي Calibrators مع 1مل من الماء المقطر Distilled water .
2- محلول السيطرةControls : خفف بإضافة محلول السيطرة Controls مع 1مل من الماء المقطر Distilled water.
3- محلول تخفيف العينة Specimen diluents : خففت العينة بإضافة ما موجود في العبوة vial إلى 1 مل من الماء المقطر Distilled water.
4- محلول الغسل Working wash solution : حضر محلول الغسل Working wash solution بإضافة 190 مل من الماء المقطر إلى 10 مل (عبوة واحدة vial) من

Working wash solution بالتخفيف إلى (x200) باستخدام المازج Magnetic stirrer للخلط أو التجانس ويكون استعماله آنيا.

5- محلول الارتباط conjugate solution : حضر بإضافة 0.2 مل من Chromogen (TMB) إلى 6 مل (عبوة واحدة vial) من المادة الأساس الدارئة Substrate buffer والمتكونة من (بيروكسيد الهيدروجين الذائب في دارئ acetate /citrate buffer) . (Tilg, 1992)

9-3 تحضير لقاح الببتيدات المجزأة Lipophosphoglycan (LPG) لطفيلي اللشمانيا

استخدمت طريقة الاستخلاص وفق المصدر (Malcolm *et al.*, 1995) وكالاتي :

1- تم استخلاص مركب LPG بواسطة مادة ساحبة للدهون delipidated من البيوتان butanـ ($10^{10} \times 1$) من الطور المسوط promastigotes لطفيلي اللشمانيا .
2- تمت تنقيه مستخلص LPG بواسطة عمود من octyl-Sepharose بابعاد (10سم × 0.5 سم) المناسب والموازن مع 0.1 مولاري من خلات الصوديوم sodium acetate في pH (7.0) الحاوي على 5% propanol .
3- ان المستخلص المحمل في العمود يكون بنسبة تدفق خلال الساعة الواحد مقدارها (5) مل / ساعه حيث العمود يزيل 0.1 مولاري من sodium acetate مع المحافظة على ثبات الـ pH (pH 7.0) في 5% برابونول ، يكون 20 مل من sodium acetate مع 5% propanol ، حيث تستخدم نسب مختلفة من propanol من 5%- الى 50% في 60 مل من الماء .
4- ان استخلاص الكاربوهيدرات يكون بمعدل 1 مايكروليتر في كل جزء نازل في العمود ، وللكشف عن هذه الكاربوهيدرات تصبغ بمادة orcinol/H_2SO_4 .
5- تزال الاجزاء الحاوية على LPG وتجمع وتجمد وتجفف الازالة المواد المتطايرة منها .

1-9-3 تهيئة الحيوانات المختبرية

استعملت فئران نوع (Bulb/c) من الذكور فقط وبعمر (8-10) أسبوع لتقييم الاستجابة المناعية بواقع 50 فأر وبثلاث مجموعات المجموعتين الاولى والثانية تلقت اللقاح لكل مجموعة 20 فأر و10 فأر لمجموعة السيطرة . وضعت في اقفاص وتحت شروط ملائمة من درجة حرارة ونظافة مستمرة وغذاء مكون من العليقة الجاهزة مع الكرفس والحليب المجفف وزهرة الشمس .

تم حقن المجموعتين باللقاح المنقى Lipophosphoglycan لطفيلي اللشمانيا الجلدية *L.tropica* للمجموعة الأولى والمستضدات السطحية للنوع *L. major* للمجموعة الثانية وبالتخفيف بمحلول الفينول سلاين phenol Saline diluent حيث حقنت ب100 مايكرو ليتر من المحلول والمعلق بها 3 مايكرو غرام من Lipophosphoglycan لكل مجموعة .

- **محلول الفينول سلاين phenol Saline diluent**

المكونات في اللتر

كلوريد الصوديوم	NaCl	5 غرام
بيكاربونات الصوديوم	$NaHCO_3$	2.75 غرام
فينول	Phenol	4 غرام
ماء مقطر	Distilled water	1000 مل

3-9-2 الاختبارات المناعية :

3-9-2-1 اختبار فرط الحساسية المتأخر

Delayed Type of Hypersensitivity (DTH)

استعمل هذا الفحص لقياس الاستجابة المناعية الخلوية

طريقة العمل

استعملت طريقة Guirges (1971) حيث وبالتخفيف بمحلول الفينول سلاين تم الحصول على التركيز المطلوب من الطفيلي حيث حقن كل حيوان في راحة القدم الخلفية اليسرى وحقنت راحة القدم الأخرى بمحلول الفينول سلاين فقط وبنفس الحجم واعتبرت كسيطرة ، سجل بعد مرور 24 ساعة مقدار التضخم الحاصل في راحة كلا القدمين وان الفرق بين القرائتين سمك الوسادة يمثل الاستجابة الخلوية .

3-9-2-2 البلعمة Phagocytosis

يهدف هذا الاختبار إلى معرفة مدى قابلية الخلايا البلعمية (Macrophage, Neutrophil) على التهام الأجسام الغريبة الداخلة في الجسم ، وقد أجري هذا الفحص حسب طريقة Furth (1985) وكما يأتي :-

1- زراعة البكتريا

تم زرع بكتريا *Staphylococcus areus* المشخصة مسبقا في كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء حيث تم في وسط الأغار المغذي (Nutrient Agar) لمدة 24 ساعة بدرجة 37 م° ثم حصدت البكتريا المنماة وغسلت بمحلول دارئ الفوسفات الملحي PBS المعقم ثلاث مرات وعند كل غسلة توضع البكتريا في جهاز الطرد المركزي بسرعة 2000 دورة / دقيقة ولمدة عشرة دقائق لترسيبها وحضر عالق من البكتريا مع محلول دارئ الفوسفات الملحي بتركيز 1×10^4 خلية بكتريه / مل وزعت في قناني معقمة بمقدار 1 مل وحفظت في المجمدة بدرجة (- 20 م) لحين الاستخدام .

2- سحب الدم

تم سحب الدم من قلب الفأر مباشرة بواسطة أبرة نبيذة معقمة سعة (1) مل , ما يقارب 300 مايكروليتر ، وضع الدم في انابيب اختبار معقمة ومغطاة بمادة السيليكون لضمان عدم امصاص البلاعم على الزجاج وحاوية على 50 وحدة دولية هيبارين / مل لمنع التخثر .

3- طريقة العمل

1 – أضيف مقدار (100) مايكروليتر من عالق البكتريا الى انبوبة اختبار حاوية على نموذج دم بمقدار (100) مايكروليتر خلال ساعة الى ساعتين .

2 – وضعت الانابيب في حمام مائي بدرجة (37) م لمدة (30) دقيقة مع التحريك المستمر.

3 – سحبت قطرة من مزيج عالق البكتريا ونموذج الدم بواسطة ماصة باستور ووضعت على احد إطراف شريحة زجاجية ثم عملت مسحة خفيفة (Smear) بواسطة شريحة زجاجية اخرى على طول الشريحة الاولى .

4 – تركت المسحة لتجف ثم ثبتت بالكحول المثلي 95% لمدة (10) دقائق .

5- صبغت المسحة بصيغة كمزا المحضرة لمدة (10) دقائق .

6- تم قراءة الشرائح الزجاجية بالمجهر الضوئي الاعتيادي وحسبت (100) خلية من كل من الخلايا البلعمية الملتهمة وغير الملتهمة حيث تمثل النسبة المؤية لكل منها وحسب المعادلة التالية :

$$\text{نسبة الخلايا الملتهمة \%} = \frac{\text{عدد الخلايا الملتهمة}}{\text{عدد الخلايا الكلي}} \times 100$$

3-2-9-3 فحص التحول اللمفاوي Lymphocyte transformation assay

استعمل هذا الاختبار لقياس الاستجابة المناعية الخلوية وهو مقياس لتحول الخلايا اللمفاوية من مرحلة السكون الى مرحلة الانقسام من خلال التغيرات الشكلية والحياتية التي تطرأ على الخلايا اللمفاوية نتيجة لتحسسها ، باستخدام المشطرات (Mitogen) في وسط الزرعي وقد استعملت طريقة Shubber and Al-Allak (1986) .

a 3-2-9-3 المحاليل والمواد المستعملة

- **محلول المضادات الحياتية (Antibiotic Solution)** : حضر بإذابة مليون وحدة دولية من البنسلين البلوري (Crystalline Penicillin) مع غرام واحد من سلفات الستربتومايسين (Streptomycine Sulphate) في (100) مل ماء مقطر وزع في قناني صغيرة سعة 5 مل وحفظ في المجمدة بدرجة (- 20م) لحين الاستعمال .

- المشطر (Mitogen) : استخدم المشطر Phytohaemagglutinin (PHA) بتركيز 100 مايكرو غرام / مل وسط زراعي .

- **محلول الهيبس (Hepes):** استخدم محلول الهيبس لتعديل الأس الهيدروجيني للوسط الزرعي ويستخدم بنسبة 1 : 100 وسط زرعي كامل المحتويات .

- **محلول الهايبوتونك (Hypotnic Solution)** : حضر بإذابة (85. 2) غرام من كلوريد البوتاسيوم (KCI) في 500 مل ماء تنائي التقطير .

- **محلول بيكاربونات الصوديوم (Sodium Bicarbonate)** : حضر بإذابة (7.5) غم من بيكاربونات الصوديوم في لتر ماء مقطر وحفظ في الثلاجة لحين الاستعمال .

- **المثبت (Fixative)** : حضر بمزج ثلاثة حجوم كحول مثيلي تركيز 95 % مع حجم واحد من حامض الخليك .

- **تحضير صبغة كمزا الأساس (Stock Giemsa stain)** حضرت بسحق غرام من مسحوق صبغة كمزا باستعمال الهاون الخزفي مزج مع 50 مل كليسيرين ثم وضع الخليط في قنينة محكمة الغلق ذات لون داكن ووضعت في حمام مائي بدرجة 60 م لمدة ساعتين مع التحريك كل نصف ساعة , ترك الخليط ليبرد ثم أضيف إليه (50) مل من الكحول المثلي تركيز 95 % تدريجياً مع التحريك المستمر بعد ذلك رشحت الصبغة بواسطة ورقة ترشيح نوع واتمان (No.l) ثم حفظت في مكان مظلم بدرجة حرارة الغرفة حيث أمكن استعمالها للتصبيغ بعد مزجها كالآتي : واحد مل من الصبغة الأساس , واحد مل محلول بيكاربونات الصوديوم ,(1.25) مل كحول مثيلي بتركيز 95% و40 مل ماء مقطر .

- **الوسط الزرعي** : حضر بإذابة 10.4غم من مسحوق الوسط الزرعي نوع Roswell park medium (RPMI 1640) مع 2 غم من بيكاربونات الصوديوم في لتر ماء ثنائي التقطير ثم أضيف إلى (10) مل من محلول المضاد الحيوي و (10) مل من الهيبس و 10 % من مصل جنين الأبقار Fetal Calf Serum (FCS)) المعامل لمدة (30) دقيقة بدرجة (50) مْ لإبطال عمل المتمم ثم رشح خلال مرشحة معقمة ذات فتحات قياس (22 . 0) مايكروميتر وحفظ في الثلاجة لحين الاستخدام .

3-9-2-3- b طريقة العمل

1- وضع الدم في أنابيب اختبار معقمة وقسم بحيث تكون لكل نموذج أنبوبتان كل منها تحتوي على 250 مايكروليتر من الوسط الزرعي و 6 قطرات من الدم أحدهما تحتوي على 250 مايكروليتر من المشطر(PHA) والأخرى بدون مشطر (أنبوبة السيطرة) .
2- رُجّت الأنابيب بهدوء ووضعت في حاضنة بدرجة 37 م لمدة ثلاث أيام على ان يتم تحريكها يومياً .
3- رسبت الخلايا باستعمال جهاز الطرد المركزي وبسرعة (2000) دورة بالدقيقة ولمدة (10) دقائق .
4- أهمل الراشح تحت ظروف معقمة وأضيف للخلايا (5) مل من محلول الهايبوتونك بالتدريج ورجت الأنابيب برفق ثم أعيدت للحاضنة بدرجة 37 م لمدة (50) دقيقة .

5- تم إجراء عملية الترسيب مرة أخرى باستخدام جهاز الطرد المركزي ولمدة (10) دقائق وأضيف المثبت (Fixative) بكمية (5) مل لكل أنبوبة بالتدريج ثم وضعت الأنابيب في الثلاجة لمدة (15) دقيقة .

6- رسبت الخلايا بالمثبت ذاته بمعدل (3-4) مرات إلى أن تكون عالق عديم اللون ثم أضيف مقدار (5. 0) مل من المثبت للخلايا المترسبة وحضر منه عالق الخلايا على شريحة وتركت لتجف على صفيحة حارة (Hot plate) بدرجة (50) م.

7- صبغت الخلايا بإضافة بضع قطرات من صبغة كمزا لمدة (10) دقائق وغسلت بالماء المقطر وتركت في جو الغرفة لتجف .

8- فحصت الشرائح الزجاجية بأستخدام المجهر الضوئي بتكبير 400 X مرة ثم حسبت 500 خلية لمفاوية منها أرومات لمفاوية (Lymphoblast) ومنها خلايا لمفاوية في طور السكون وتم احتساب نسبها حسب المعادلة الاتية :-

$$\text{نسبة تكون الأرومات اللمفاوية} = \frac{\text{عدد الأرومات اللمفاوية}}{\text{العدد الكلي للخلايا اللمفاوية}} \times 100$$

10-3 التحليل الاحصائي Statistical Analysis

تم تحليل البيانات التجريبية من حيث الأرقام المرصودة والنسب المئوية ، بواسطة (SPSS 10.01) لمعرفة الفروق المعنوية باستعمال ما يلي :

1- اختبار مربع كاي Chi-square test : واعتبرت $P\ value \leq 0.05$ ذات دلالة احصائية .

2- اختبار مربع كاي Chi-square test : واعتبرت $P\ value \leq 0.01$ ذات دلالة احصائية .

3- تحليل التباين باستخدام اختبار (ANOVA) : واعتبرت $P\ value \leq 0.05$ ذات دلالة احصائية .(SAS, 2001)

الفصل الرابع

النتائج Results

1-4 عزل اللشمانيا الجلدية (CL) من القرح الجلدية في المصابين

Isolation of cutaneous leishmaniasis (CL) from skin lesions in patients

جرى الكشف عن الخمج بداء اللشمانيّا الجلدية حيث اظهرت النتائج وكما مبين في الجـدول (4-1) ان هناك (225) حالة اصابة بداء اللشمانيّا في مستشفيات بعض محافظات القطر منها (125) حالة شخصت في محافظة كربلاء تم اثباتها مختبريا وسريرياً وللفترة من شهر تشرين الاول 2011 الى شهر آذار2013 بالنسبة للمحافظات قيد الدراسة عدا محافظة كربلاء حيث شملت اشهر السنة جميعها .

جدول (4-1): اعداد حالات الاصابة بداء اللشمانيا الجلدية (CL) في بعض المحافظات العراقية

المحافظة	عدد حالات الاصابة	%
بغداد	13	5.77
بابل	9	4.0
كربلاء	125	55.55
النجف	10	4.44
الديوانية	16	7.11
المثنى	6	2.66
الناصرية	11	4.88
واسط	24	10.66
البصرة	11	4.88
المجموع	225	100
$\chi^2 = (11.67)^{**}$		

**= P < 0.01

2-4 توزيع الاصابة بداء اللشمانيّا الجلدية بين المصابين استنادا الى العمر والجنس

Distribution of cutaneous leishmaniasis according to gender and age

في الجدول (4-2) أظهرت النتائج ان نسبة الذكور 131 (58.22%) تفوق على نسبة الاناث 94(41.77%) اذ بينت النتائج وجود فروق معنوية وبمستوى $p < 0.05$ ومستوى $p < 0.01$ بين الذكور والاناث وبأغلب الفئات العمرية ولكن اكثر المصابين بداء اللشمانيّا الجلدية (CL) الوافدين الى المستشفيات هم من الذكور في الفئات العمرية (10-15) سنة واقلها الاعمار اقل من 50 سنة .

جدول (4-2): توزيع الاصابة بداء اللشمانيا الجلدية استنادا الى العمر والجنس

الفئات العمرية بالسنة	الذكور	الاناث	المجموع	χ^2
≥1	4	3	7	*5.39
5-1	7	5	12	*5.47
10-6	32	16	48	**10.72
15-11	34	28	62	*4.38
20-16	21	8	29	**10.91
25-21	8	9	17	1.46 (N.S)
30-26	7	5	12	**5.47
35-31	6	8	14	*5.39
40– 36	3	3	6	(N.S)
45-41	4	5	9	*4.58
50-46	3	2	5	**7.25
≥ 51	2	2	4	(N.S)
المجموع	131 (% 58.22)	94 (41.77%)	225	5.49*

*= P <0.05 **= P < 0.01

3-4 توزيع الاصابة باللشمانيا الجلدية استناداً الى طبيعة السكن والجنس

Distribution of cutaneous leishmaniasis according to residence and gender

لقد أظهر توزيع حالات الاصابة بالاعتماد على نوع السكن أن المرض كان واضحا في 86 مريضا (38.22%) من المناطق الحضرية وفي 139 مريضا (61.77%) من المناطق الريفية وبفارق معنوي بين نوع السكن قيمته $P<0.01$ وكما في الجدول (4-3) .

جدول (4-3): يوضح توزيع الاصابة استنادا الى طبيعة السكن والجنس

المناطق الحضرية Urban Regions		المناطق الريفية Rural Regions	
الذكور	الاناث	الذكور	الاناث
1	1	3	2
2	2	5	3
13	6	19	10
14	13	20	15
9	3	12	5
4	3	4	6
2	2	5	3
1	3	5	5
1	2	2	1
1	2	3	3
0	0	3	2
0	1	2	1
86 (38.22%)		139 (61.77%)	
$\chi 2 = (9.71)$ **			

4-4 توزيع الاصابة باللشمانيا الجلدية نسبة الى عدد قرح الإصابة

Distribution of cutaneous leishmaniasis according to number of lesions

كشفت النتائج عن وجود فروق معنوية في عدد القرح الجلدية بمستوى 0.01> p بين الذكور والاناث وفي عدد القرح جدول (4-4) وكان الخمج بقرحة واحدة في الذكور اكثر من الاناث 83 (58%) ثم قرحتين 41 (62%) ، أما حالة الاصابة بثلاث أو أربع قرح فكانت متقاربة في الاناث والذكور .

جدول (4-4) : توزيع الاصابة باللشمانيا الجلدية نسبة الى عدد قرح الاصابة

الجنس	عدد القرح Number of Lesions				المجموع
	1	2	3	4	
الذكور	(%58) 83	(%62)41	(%46.15) 6	(%33.33)1	131
الاناث	(%41.9)60	(%37.8)25	(%53.84) 7	(%66.66)2	94
المجموع	143	66	13	6	225

4-5 توزيع الخمج بداء اللشمانيّا الجلدية للوافدين طبقاً الى مناطق الجسم

Distribution of cutaneous leishmaniasis according to the site of lesion

بين الجدول (4-5) دراسة تركز الخمج في الوجه حيث بلغ عدد الآفات 99 بنسبة (44%) ثم يليه الاطراف السفلى 92 بنسبة (40.88 %) ثم الاطراف العليا 33 بنسبة (14.66%) أما فيما يخص الجذع فأظهرت النتائج وجود حالة اصابة واحدة فقط وبنسبـة (0.44 %) حيث كان الفرق المعنوي 0.01> p . (صورة رقم 4-1)

جدول (4-5): يوضح توزيع الاصابة بالنسبة لموقعها على مناطق الجسم

مكان الاصابة Site of Lesion	الذكور	الاناث	المجموع	%
الوجه face	56	43	99	44
الاطراف العليا Upper extremities	20	13	33	14.66
الاطراف السفلى Lower extremities	51	41	92	40.88
الجذع Trunk	1	0	1	0.44
المجموع			225	100
$\chi 2 = (11.64)$ **				

**= P< 0.01

6-4 توزيع اللشمانيا الجلدية استناداً الى نوع القرحة

Distribution of cutaneous Leishmaniasis according to type of lesion

بينت الدراسة أن 46 مريضا (20.44%) لديهم الاصابة الجافة في حين سجلت الاصابة الرطبة 179حالة (79.55%) من المرضى الجدول (4-6) .

جدول (4-6): يبين اعداد المصابين من الذكور والاناث استنادا الى نوع القرحة

نوع القرحة Type of lesion	الذكور	الاناث	المجموع	%
القرحة الرطبة Wet lesion	101	78	179	79.55
القرحة الجافة Dry lesion	33	13	46	20.44
المجموع 225	$\chi 2 = (12.86)$ **			100

**= P< 0.01

صورة (4-1): تبين طفلة بعمر 3 سنوات من محافظة واسط مصابة بحبة بغداد (القرحة الجافة) في موقعين الوجه والاطراف السفلى

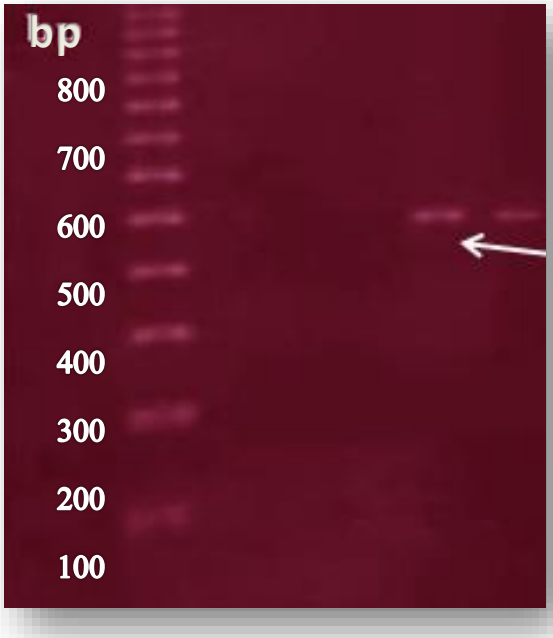
7-4 الدراسة الجزيئية وتشخيص انواع اللشمانيا الجلدية بواسطة تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي

Detection of *Leishmania* by Polymerase Chain Reaction (PCR)

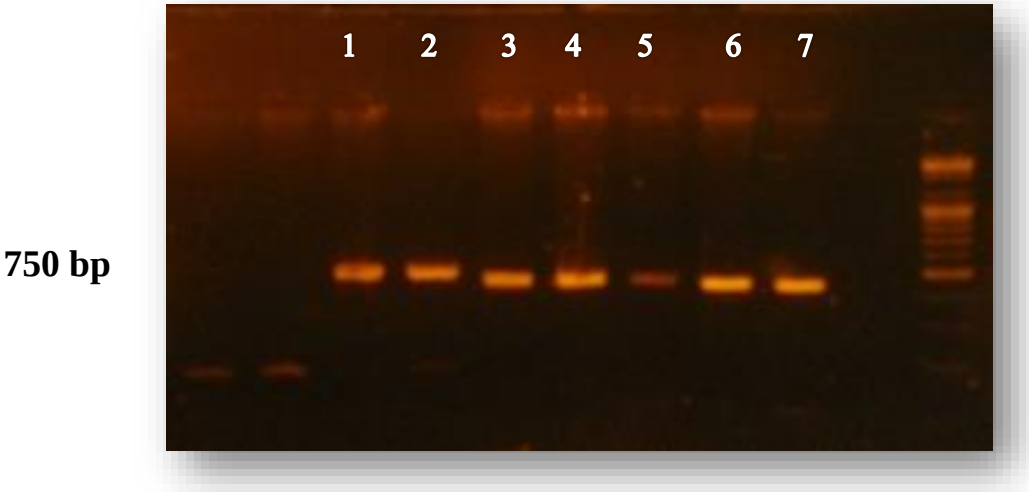
استعملت تقنية PCR لتحديد نوع الطفيلي المسبب لداء اللشمانيا الجلدية ، تم استخلاص الدنا DNA لطفيلي اللشمانيا kDNA من العينات كافة وترحيله كهربائيا للتأكد من وجوده بالعين المجردة (صورة 4-2) ثم تم حفظه في التبريد اللازم لحين الاستعمال .

أنجزت التفاعلات باستعمال جهاز الـ PCR لنسخ جزء معين من الحامض النووي وتضخيم هذا الجزء عدديا ، تم الحصول على حزمة بطول 560 bp في النوع *L .major* و 750 bp في النوع *L. tropica* واستخدمنا في هذه الدراسة تفاعل PCR على DNA المعزول من العينات جميعها ، رُحلت نواتج تفاعل PCR على هلام ألاكاروز تركيزها 2% ، فأظهرت السلالات المدروسة حزماً بطول 750bp (39 عينة) تنتمي لنوع اللشمانيا المداريا *L .tropica* و 560 bp (186عينة) اللشمانيا الكبرى *L .major* صورة (4-3)،(4-4) ويشمل الجدول (4-7) توزيع نوع عزلة اللشمانيا الجلدية على المحافظات قيد الدراسة .

صورة (4-2) : توضح وجود الدنا DNA المستخلص من طفيلي اللشمانيا الجلدية من خلال الترحيل الكهربائي في جل الاكاروز



صورة (4-3): الترحيل الكهربائي لنتائج تنميط لعزلات من (*Leismania major*) bp560 بواسطة تقنية الـ PCR



صورة (4-4): الترحيل الكهربائي لنتائج تنميط 7 عزلات من (*Leismania tropica*) 750 pb بواسطة تقنية الـ PCR

جدول (4-7): التشخيص الجزيئي لطفيلي اللشمانيا الجلدية في بعض محافظات القطر موضحا نوع العترة في كل محافظة

المحافظة	عدد الحالات	PCR	
		L. tropica	*L. major*
بغداد	13	3	10
بابل	9	2	7
كربلاء	125	21	104
النجف	10	2	8
الديوانية	16	5	11
المثنى	6	1	5
الناصرية	11	0	11
واسط	24	3	21
البصرة	11	2	9
المجموع	225	39	186
%	(%100)	%17.33	%82.66
χ^2	$\chi^2 = (13.07)$ **		

**= P< 0.01

8-4 التشخيص بتقنية الـ PCR للشمانيا الجلدية بالمقارنة مع الجنس والفئات العمرية

PCR of cutaneous leishmaniasis according to gender in different age groups

يبين الجدول (4-8) ان النسب المئوية لتوزيع نوع الاصابة على الاناث والذكور كانت غير معنوية للنوع الجلدي *L. tropica* ، بينما شكلت فرقا معنويا بين الذكور والاناث للنوع

L .major ، اما بين انواع اللشمانيا والفئات العمرية فقد كان الفرق المعنوي واضحا وبدلالة احصائية $P<0.01$.

جدول (4-8): توزيع انواع الاصابات الجلدية المشخصة في تقنية PCR تبعا للجنس والفئات العمرية

الفئات العمرية بالسنة	*L. tropica*		*L. major*		المجموع	%
	الذكور	الاناث	الذكور	الاناث		
≥1	1	1	3	2	7	3.11
5-1	2	1	5	4	12	5.33
10-6	8	5	24	11	48	21.33
15-11	5	2	29	26	62	27.55
20-16	1	2	20	6	29	12.88
25-21	1	3	7	6	17	7.55
30-26	2	1	5	4	12	5.33
35-31	1	1	5	7	14	6.22
40– 36	0	1	3	2	6	2.66
45-41	0	0	4	5	9	4
50-46	0	1	3	1	5	2.22
≥ 51	0	0	2	2	4	1.77
المجموع	21 (%53.85)	18(%46.15)	110(%59.14)	76(%40.86)	225	100
χ 2	χ 2 =1.60 NO الفرق المعنوي بين الجنس 39 (%17.33)		χ 2 =6.82 ** الفرق المعنوي بين الجنس 186 (%82.67)		χ 2 =9.37 **الفرق المعنوي بين الفئات العمرية	
	** 13.76= χ 2 الفرق المعنوي بين الانواع					

= P< 0.01

9-4 اللشمانيا الجلدية في محافظة كربلاء المقدسة

Cutaneous leishmaniasis in Karbala province according to districts and months

جمعت عينات محافظة كربلاء للفترة من تشرين الاول 2010 الى ايلول 2012 من المرضى الوافدين الى مستشفى الحسين العام والمستوصف الخاص بقضاء عين التمر ومستوصف ناحية الحسينية حيث كانت للفترة 2010-2011 73 اصابة وللفترة 2011-2012 كانت 52 اي بمجموع 125 للعامين وبنسبة 58.4 % و 41.6 % على التوالي .

اما فيما يخص التوزيع الموسمي لداء اللشمانيا الجلدية ، فقد وجد من خلال عدد المصابين الوافدين الى المستشفيات ظهور الخمج ابتداء من شهر ايلول ثم اخذت بالازدياد تدريجيا وبشكل معنوي وبمستوى $P< 0.05$ في شهر تشرين الاول وتشرين الثاني وللعامين (2010-2011) و(2011-2012) ، وكانت اعلى الاعداد في كانون الاول وكانون الثاني وشباط واذار ثم بدأت بالتناقص في نهاية شهر اذار واخذت تقل تدريجيا وتصل اقل نسبة في تموز واب جدول(4- 9 a ، b ، c وd).

جدول (4-9-a) : توزيع المرضى المصابين بداء اللشمانيّا الجلدية حسب مناطق السكن في محافظة كربلاء لعام (2010-2011)

مناطق السكن	الذكور	الاناث	العدد الكلي	%
قضاء عين التمر	19	10	29	39.7
ناحية الحسينية	12	9	21	28.7
ناحية الحر	5	4	9	12.3
الاحياء الجنوبية	5	3	8	10.9
الاحياء الشمالية	3	1	4	5.4
مركز المحافظة	1	1	2	2.7
المجموع	45	28	73(58.4%)	100
χ 2	** 11.31 الفرق المعنوي بين مناطق السكن			

**= P< 0.01

جدول (4-9-b): توزيع اللشمانيا الجلدية في محافظة كربلاء استنادا الى شهور السنة (تشرين الاول 2010 الى ايلول 2011) .

الشهر	الذكور	الاناث	العدد الكلي	%
تشرين الاول 2010	8	4	12	16.4
تشرين الثاني 2010	9	5	14	19.1
كانون الاول 2010	8	5	13	17.8
كانون الثاني 2011	7	3	10	13.6
شباط 2011	7	2	9	12.3
اذار 2011	5	3	8	10.9
نيسان 2011	1	2	3	4.1
مايس 2011	1	1	2	2.7
حزيران 2011	0	1	1	1.3
تموز 2011	0	0	0	0
اب 2011	1	0	1	1.3
ايلول 2011	0	0	0	0
المجموع	47 (%64.4)	26 (%35.6)	73	100

جدول (4-9-c) : توزيع المرضى المصابين بداء اللشمانيّا الجلدية حسب مناطق السكن في محافظة كربلاء لعام (2011-2012)

مناطق السكن	الذكور	الاناث	العدد الكلي	%
قضاء عين التمر	12	10	22	42.3
ناحية الحسينية	7	2	8	15.3
ناحية الحر	3	5	8	15.3
الاحياء الجنوبية	2	6	8	15.3
الاحياء الشمالية	3	0	3	5.7
مركز المحافظة	2	1	3	5.7
المجموع	28	24	(%41.6)52	100
χ 2	** 9.04 الفرق المعنوي بين مناطق السكن			

****= P< 0.01**

جدول (4-9-d): توزيع اللشمانيا الجلدية في محافظة كربلاء استنادا الى اشهر السنة (تشرين الاول 2011 الى ايلول 2012) .

الشهر	الذكور	الاناث	العدد الكلي	%
تشرين الاول 2011	5	3	8	15.3
تشرين الثاني 2011	3	4	7	13.4
كانون الاول 2011	7	4	11	21
كانون الثاني 2012	5	4	9	17.3
شباط 2012	5	3	8	15.3
اذار 2012	2	0	2	3.8
نيسان 2012	0	3	3	5.7
مايس 2012	0	1	1	1.9
حزيران 2012	1	0	1	1.9
تموز 2012	0	2	2	3.8
اب 2012	0	0	0	0
ايلول 2012	0	0	0	0
المجموع	28(53.8%)	24(46.1%)	52	100

4-10 انواع الطفيليات المسببة للشمانيا الجلدية في محافظة كربلاء

اظهرت الدراسة التشخيصية الجزيئية بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل ان داء اللشمانيا الجلدي في محافظة كربلاء قد تسبب عن نوعين من طفيلي اللشمانيا هما اللشمانيا المدارية *L. tropica* وكانت بنسبة 31 بنسبة (24.8%) وبواقع 22 بنسبة (17.6%) للذكور و9 بنسبة (7.2%) للإناث ، واللشمانيا الكبرى *L. major* كانت بنسبة 94 بنسبة (75.2%) والنسبة بين النوعين 55 بنسبة (44%) و39 بنسبة (31.2%) للذكور والاناث على التوالي ، وظهر الفرق المعنوي واضحا بين الانواع . جدول (4-10) .

جدول (4-10): توزيع اللشمانيا الجلدية في محافظة كربلاء استنادا الى نوع الطفيلي

المنطقة السكنية	عدد الحالات	PCR			
		L. tropica		*L. major*	
		الذكور	الاناث	الذكور	الاناث
قضاء عين التمر	51	12	4	24	11
ناحية الحسينية	29	3	2	13	11
ناحية الحر	17	4	1	6	6
الاحياء الجنوبية	16	2	2	7	5
الاحياء الشمالية	7	1	0	4	2
مركز المحافظة	5	0	0	1	4
المجموع	125	(%17.6) 22	(%7.2) 9	(%44) 55	(%31.2) 39
%	%100	(%24.8) 31		(%75.2) 94	
χ 2		9.55 **			

**= P< 0.01

11-4 الدراسة المناعية للمرضى المصابين بداء اللشمانيا الجلدية في محافظة كربلاء

1-11-4مستويات الغلوبيولينات المناعية الكلية IgG و IgM لدى المصابين بطفيلي اللشمانيا الجلدية الكبرى (*L. major*) بتقنية الاليزا (ELISA)

a. مستوى الكلوبيولين المناعي الكلي IgG :

ان معدل مستوى الكلوبيولين المناعي IgG في المرضى المصابين بداء اللشمانيا الجلدية الكبرى (*L. major*) كان (1811.1 ± 523.1 ملغم / د.لتر) وهو ذو دلالة احصائية مقارنة مع معدل قيمته في الاشخاص الاصحاء (مجموعة السيطرة) والذي بلغ (775.0 ± 162.4 ملغم / د.لتر) حيث كان الفرق المعنوي ($P< 0.05$) .

واظهرت النتائج ان معدل مستوياته بعد المعاملة بعقار البنتوستام المستخدم كعلاج كانت (899.1 ± 85.5 ملغم / د.لتر) والتي اختزلت فيما بعد ، لكن بقيت النسبة عالية الى حد ما مقارنة بمجموعة الاشخاص الاصحاء ($p \geq 0.05$) جدول (4-11-1 a و b).

b.مستوى الكلوبيولين المناعي الكلي IgM :

وجد ان معدل مستوى الكلوبيولين المناعي IgM في مرضى اللشمانيا الكبرى كان (23.6 ± 166.7 ملغم / د.لتر) وقد ارتفع عن مجموعة السيطرة(119.0± 21.5 ملغم / د.لتر) بفارق معنوي ($P< 0.05$) ، اما بعد العلاج فكانت معدل مستوى IgM (129.4 ± 18.1 ملغم / د.لتر) مشكلا فرقا معنويا بين المعاملتين قبل وبعد العلاج ($P< 0.05$) ، وليس هناك فرق معنوي بين المعاملتين قبل وبعد العلاج مع مجموعة السيطرة ($p > 0.05$) . جدول (4-11-1 a و b) .

جدول (a-1-11-4) : معدل التراكيز للكلوبيولين المناعي IgG ، IgM في امصال (94) مريض مصاب باللشمانيا الجلدية الكبرى (*L. major*)

الكلوبيولين المناعي	IgG ± الخطأ القياسي ملغم / د.لتر	IgM ± الخطأ القياسي ملغم / د.لتر
المصابين	523.1 ± 1811.1	23.6 ± 166.7
مجموعة السيطرة	775.0 ± 162.4	21.5 ± 119.0
P- value	< 0.05	< 0.05

جدول(b-1-11-4): معدل التراكيز للكلوبيولين المناعي IgG و IgM في امصال (94) مريض مصاب باللشمانيا الجلدية الكبرى (*L. major*) عند المعاملة وفي فترة العلاج.

الكلوبيولين المناعي	ايام العلاج			
	0	7	14	21
IgG	51.7 ± 1790.5	59.4±1550.3	45.5±1140.4	85.5±899.1
IgM	15.9± 156.8	18.1±150.7	13.8± 139.6	18.1±129.4

2-11-4 مستويات الغلوبيولينات المناعية الكلية IgG وIgM لدى المصابين بطفيلي اللشمانيا الجلدية المدارية (*L. tropica*) بتقنية الاليزا (ELISA)

a. مستوى الكلوبيولين المناعي الكلي IgG :

اظهرت الدراسة المصلية لتركيز الكلوبيولين المناعي IgG لمرضى اللشمانيا المدراية فرق معنوي في القيمة الاحصائية حيث بلغ المعدل (1722.1 ± 524.0ملغم/ د.لتر) مقارنة مع معدل مجموعة السيطرة للأشخاص الاصحاء (665.0 ± 142.3ملغم /د.لتر) ، عند الدلالة (P< 0.05).

ولقد انخفضت النسبة بعد العلاج واخذ العقار اللازم وكانت (1099.1 ±45.3 ملغم /د.لتر) ولم تظهر معدلات مستويات الكلوبيولين فرق معنوي مع مجموعة السيطرة ($p > 0.05$) . جدول (a-2-11-4 و b)

b. مستوى الكلوبيولين المناعي الكلي IgM :

وجد ان معدل مستوى الكلوبيولين المناعي IgM ارتفع ايضا في مرضى اللشمانيا المدارية (182.9 ±25.3ملغم / د.لتر) عن مجموعة السيطرة التي بلغت (126.1 ±28.0ملغم / د.لتر) بفارق معنوي بدلالة ($P< 0.05$) ، وبعد العلاج كانت المعدل (130.0 ±17.2ملغم /د.لتر) لم يكن هنالك فرق معنوي مع مجموعة السيطرة . جدول (a-2-11-4 و b) .

جدول (a-2-11-4): يوضح معدل التراكيز للكلوبيولين المناعي IgG و IgM في امصال (31) مريض مصاب باللشمانيا الجلدية المدارية (*L. tropica*)

الكلوبيولين المناعي	IgG ± الخطأ القياسي	IgM ± الخطأ القياسي
المصابين	524.0±1722.1	25.3±182.9
مجموعة السيطرة	142.3±665.0	28.0±126.1
P- value	< 0.05	< 0.05

جدول (4-11-2-b): معدل التراكيز للكلوبيولين المناعي IgG و IgM في امصال (31) مريض مصاب باللشمانيا الجلدية المدارية (*L.tropica*) عند المعاملة وفي فترة العلاج

الكلوبيولين المناعي	ايام العلاج			
	0	7	14	21
IgG	41.2 ±1655.5	49.1 ±1430.3	35.9 ±1150.4	45.3 ± 1099.1
IgM	19.2 ±166.2	15.6 ±140.5	14.6 ±137.7	130.0 ±17.2

3-11-4 مستويات المدورات الخلوية لدى المصابين بطفيلي اللشمانيا الجلدية الكبرى (*L. major*)

a. مستويات الانترفيرون – كاما البشري (IFN – γ) Human interferon – gamma :

سجل ارتفاع معنوي (P< 0.05) في معدلات الانترفيرون – كاما للمرضى المصابين باللشمانيا الجلدية الكبرى بلغ (113.2 ± 5.5 ملغم/د.لتر) مقارنة مع مجموعة السيطرة (6.55± 2.2 ملغم/د.لتر) جدول .

وكان هناك انخفاض معنوي في مستويات الانترفيرون- كاما في المصل بعد المعالجة (6.05 ± 3.0ملغم /د.لتر) عما هو في المجموعة قبل العلاج ، بينما لم يكن هناك فرق معنوي بين المجموعة بعد المعاملة ومجموعة السيطرة (p > 0.05) . جدول (4-11- a3 و b)

b. مستويات الحركي الخلوي IL-10 :

اظهرت النتائج زيادة في مستوى IL-10 عند مصل المرضى وكان بمعدل (9.8±215.0 ملغم /د.لتر) عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة (6.92 ±4.4 ملغم /د. لتر) . وفي مجموعة بعد المعاملة بالعلاج اصبح المستوى (9.02 ±5.1ملغم /د.لتر) وهو فرق معنوي اقل مما في مجموعة

قبل المعاملة ($P< 0.05$) ، ولم تظهر النتائج فرقا معنويا بين مجموعة بعد المعاملة ومجموعة السيطرة ($p > 0.05$) . جدول (4-11-3- a و b) .

جدول (4-11-3-a): معدل تراكيز السايتوكينات SE ± لـ (94) مريض مصاب باللشمانيا الجلدية الكبرى (*L. major*) ومجموعة السيطرة الاصحاء

نوع السايتوكين	مجموعة السيطرة	المصابين	P- value
IFN- γ ملغم / د.لتر	6.55±2.2	113.2±5.5	< 0.05
IL-10 ملغم / د.لتر	6.92±4.4	215.0±9.8	< 0.05

جدول (4-11-3-b) يوضح مستويات المصل بالملغم /د. لتر لكل من IFN- γ و IL-10 لـ (94) مصاب باللشمانيا الجلدية الكبرى مقاس بتقنية الاليزا قبل وخلال وبعد العلاج

نوع السايتوكين	ايام العلاج			
	0	7	14	21
IFN- γ	5.3 ± 110.3	3.7±19.21	8.17 ± 3.9	6.05±3.0
IL-10	202.3 ± 8.9	56.03 ± 9.1	18.99 ± 8.7	9.02±5.1

4-11-4 مستويات الحركيات الخلوية لدى المصابين بطفيلي اللشمانيا الجلدية المدارية (*L.tropica*)

a. مستويات الانترفيرون – كاما البشري (IFN – γ) Human interferon – gamma :

بالنسبة لنتائج الاصابة باللشمانيا الجلدية المدارية فقد كان معدل مستويات الانترفيرون – كاما فرقا معنويا في الارتفاع ايضا عن مجموعة السيطرة وبمستوى دلالة ($P< 0.05$) حيث بلغت (88.2±6.5 ملغم /د.لتر) اما مجموعة السيطرة فكانت (7.33±2.5 ملغم /د.لتر) . واما في فترات العلاج فلم يظهر فرق معنوي بين مجموعة بعد المعاملة ومجموعة السيطرة ($p > 0.05$) حيث كانت المعدل (7.05±3.1 ملغم /د.لتر) . جدول (4-11-4-a) و (4-11-4-b) .

b. مستويات الحركي الخلوي IL-10 :

اظهرت النتائج فرقا معنويا ($P< 0.05$) في مستوى الانترليوكين-10 لامصال المرضى المصابين باللشمانيا الجلدية المدارية وكان (115.0±8.8 ملغم/د.لتر) عند المقارنة مع مجموعة السيطرة (**11.52 ±5.4** ملغم/د.لتر) ، ولم يظهر المعدل (11.02±5.1 ملغم/د.لتر) فرق معنوي واضح ($p < 0.05$ مع مجموعة السيطرة بعد العلاج . جدول (4-11-4-a وb) .

جدول (4-11-4-a): معدل تراكيز السايتوكينات SE ± لـ (31) مريض مصاب باللشمانيا الجلدية المدارية (*L. tropica*) ومجموعة السيطرة الاصحاء

نوع السايتوكين	مجموعة السيطرة	المصابين	P- value
IFN- γ ملغم / د.لتر	7.33±2.5	88.2±6.5	< 0.05
IL-10 ملغم / د.لتر	11.52±5.4	115.0±8.8	< 0.05

جدول (b-4-11-4): مستويات IFN- γ و IL-10 لـ (31) مصاب باللشمانيا الجلدية المدارية مقاس بتقنية الاليزا قبل وخلال وبعد العلاج

نوع السايتوكين	ايام العلاج			
	0	7	14	21
IFN- γ	77.3 ± 4.3	20.21 ± 2.7	11.17 ± 3.5	7.05±3.1
IL-10	101.3 ± 7.1	66.03 ± 8.8	20.99 ± 7.7	11.02±5.1

12-4 دراسة تأثير لقاح المستضد اللشماني المنقى Lipophasphoglycan (LPG) في الحيوانات المختبرية

في اختبار التحول اللمفاوي بلغت النسبة المئوية للخلايا المتحولة اللمفاوية في حيوانات المجموعة الاولى 6.5 % ، بينما كانت في حيوانات المجموعة الثانية 12.6 % ، اما مجموعة السيطرة فكانت 4.7% ، وقد كانت هناك فروق احصائية بين المجموعات الثلاثة وبمستوى معنوية $P< 0.05$.

أما بالنسبة لاختبار فرط الحساسية المتأخر فقد كان معدل سمك الوسادة للقدم (اليسرى) المحقنة بالمستضد والقدم (اليمنى) المحقنة بمحلول الفينول – سلاين فقط (1.21 ± 0.20) ملم للمجموعة الاولى ، و (1.45 ± 0.10) ملم لحيوانات المجموعة الثانية ، اما لحيوانات السيطرة فقد بلغت (0.44 ± 0.05) ملم ، وقد ظهرت فروقات معنوية واضحة بين المجموعات الثلاثة وبمستوى معنوي $P< 0.05$.

وأظهرت نتائج اختبار البلعمة وجود فروق معنوية ايضا بين المجموعات الثلاثة وبمستوى معنوي $P< 0.05$ ايضا ، فقد بلغت النسبة المئوية لمجموع الخلايا الملتهمة 17% ، 27.6% للمجموعتين الاولى والثانية على التوالي ، بينما كانت لمجموعة السيطرة 9.10% .

وتظهر الاختبارات الثلاث واضحة باختبار الفعالية المستضدية لجنسي اللشمانيا في الجداول (4-12-a) ، (4-12-b و c) وبعد مدة 15 يوم من الحقن .

جدول (4-12-a): يمثل معدلات نسب الخلايا اللمفاوية المتحولة في مجموعات الفئران المحقنة بتركيز لقاح مستضد اللشمانيا (LPG) ومجموعة السيطرة بعد (15) يوم من الحقن

المجموعة الملقحة	معدل نسبة تحول الخلايا اللمفاوية %
المجموعة الاولى *L.tropica* (20 فأر)	% 6.5
المجموعة الثانية *L. major* (20 فأر)	% 12.6
مجموعة السيطرة control (10 فأر)	%4.7

جدول (4-12-b): يمثل نتائج اختبار فرط الحساسية المتأخر في مجموعات الفئران المحقنة بتركيز لقاح مستضد اللشمانيا (LPG) ومجموعة السيطرة

المجموعة الملقحة	نتيجة الاختبار (الفرق بالملم) ± الخطأ القياسي	شدة التفاعل
المجموعة الاولى *L.tropica* (20 فأر)	(1.21 ± 0.20) ملم	+
المجموعة الثانية *L. Major* (20 فأر)	(1.45 ± 0.10) ملم	+
مجموعة السيطرة control (10 فأر)	(0.44 ± 0.05) ملم	–

* نتيجة الاختبار الفرق بالملم بين سمك وسادة القدم اليسرى المحقنة بالمستضد وسمك وسادة القدم اليمنى المحقنة بالفينول – سلاين قياس الفرق بعد مرور 24 ساعة من الحقن بالمستضد

جدول (4-12-c): يمثل معدلات نسب الخلايا الملتهمة في مجموعات الفئران المحقنة بتركيز لقاح مستضد اللشمانيا (LPG) ومجموعة السيطرة بعد مرور (15) يوم من الحقن

المجموعة الملقحة	معدل نسبة الخلايا الملتهمة %
المجموعة الاولى *L.tropica* (20 فأر)	%17
المجموعة الثانية *L. Major* (20 فأر)	%27.6
مجموعة السيطرة control (10 فأر)	%9.10

13-4 تقييم سلامة لقاح مستضد اللشمانيا المنقى Lipophasphoglycan(LPG)

لم تظهر في حيوانات المجموعة الاولى والثانية آفة جلدية خلال مدة المتابعة (90) يوم عدا القليل من التورم والاحمرار في ثلاثة من الحيوانات المستخدمة في هذه التجربة .

الفصل الخامس

المناقشة Discussion

1-5 دراسة لأنواع اللشمانيا الجلدية ومميزاتها في بعض محافظات القطر

سجلت كل من اللشمانيا الجلدية CL والاحشائية VL (حبة بغداد والحمى السوداء) في العراق بنوعيها والناجمة عن *L.donovani* ، *L.major* و *L.tropica* (Rasheed,2004 ; Mohebali *et al* ., 2002) اذ لوحظ ارتفاع معدل الاصابة باللشمانيا الجلدية لعام 2010 اذ بلغ (0.96) عما كانت عليه في عام 2009 حيث سجلت (0.65) لكل 1000 من السكان وكانت محافظة ميسـان قد سجلت اعلى المعـدلات وبلغـت (6.14) وادنى المحافظات كانت محافظة بـغداد / الرصافة حيث كان معـدل الاصـابة فيـها (0.05) لكل1000 نسمة من السكان علما ان المحافظات الشمالية سجلت (13) حالة منها (12) حالة في محافظة السليمانية . بينما في الحمى السوداء كان معدل الاصابة لعموم العراق قد ارتفع من (0.48) في عام 2009 الى (0.57) في عام 2010 . وقد سجلت محافظة ديالى اعلى معدل للإصابة وبلغت (2.92) لكل 1000نسمة من السكان وسجلت محافظة نينوى ادنى معدل للإصابة وبلغت (0.003) لكل 1000 نسمة من السكان لعام 2010 اما المحافظات الشمالية فلم تسجل اية اصابة للعامين 2009 و2010 (التقرير السنوي لوزارة الصحة في جمهورية العراق لعام 2010) .

هدفت هذه الدراسة إلى تحديد نوع الطفيلي المسبب لداء اللشمانيا الجلدي المعزولة من المرضى المراجعين للمستشفيات في بعض محافظات القطر لكون داء اللشمانيا الجلدي Cutaneous Leishmaniasis (CL) بشكليه الريفي والحضري هو من الأمراض المتوطنة والتي تعتبر مشكلة صحية كبيرة في أنحاء كثيرة من المحافظات العراقية مع تزايد حالات الإصابة وظهور بؤر جديدة للمرض . لذلك كان تحديد أنواع الطفيليات ونوع المرض مهم جدا لعلاج المرض ، وكذلك من أجل التخطيط لبرنامج مكافحة جديدة (Mahdy, 2010) . اضافة الى ان لهذا المرض وبائية غير مستقرة مع ظهور تقلبات غير متوقعة في عدد من الحالات ونسب الاصابة في كل محافظة (Abdullah *et. al.* , 2012) .

يتم تشخيص اللشمانيا الجلدية في المناطق المستوطنة من مظاهرها السريرية الى حد كبير ، لكن قد تظهر تحديات كثيرة في التشخيص عندما تظهر حالات المرض في المناطق غير المتوطنة ، وعندما تكون المظاهر السريرية غير واضحة بالشكل الكافي بسبب ظهور بعض التغيرات الشاذة حتى في المناطق الموبوءة احيانا بالإضافة الى ذلك قد تحدث عدوى ثانوية او سوء معاملة للمرض تؤدي الى تغير في الصورة السريرية للشمانيا الجلدية مما يسبب صعوبة في التشخيص وتأخر في العلاج ، وعلى الرغم من ان حالات اللشمانيا الجلدية في العراق قد سجلت لكن الوبائية والمواصفات لم تكن موثقة كفاية (Jarallah , 2009).

إن التشخيص الصحيح لأنواع اللشمانيا اصبح امر ضروري لتحديد التشخيص السريري وبالتالي اتباع انواع محددة من العلاجات (Fazaeli *et al* ., 2008) ، ولقد اشارت المعلومات المستحصلة من المرضى في المناطق المدروسة بان دراسة تشخيص وصفات انواع جنس اللشمانيا تعتمد على عدة عوامل مثل التوزيع الجغرافي للعزلات الماخوذة ، وجود حيوانات خازنة مثل الكلاب و القوارض ، استعمال المبانى المفتوحة أو المدارس التي تجذب وتؤوي العديد من انواع الحشرات فضلا عن المساحات الكبيرة من مياه الصرف الصحي و منطقة المقابر بالقرب من السكان ، واتفقت هذه النتائج مع Al-Samarai and Al-Obaidi (2009) في تكريت الذي أفاد أن وجود الحيوانات مثل القوارض الخازنة ، والكلاب ، لعبت دورا هاما في وجود و توزيع CL.

بينت نتائج الدراسة ان هناك 225 حالة اصابة بداء اللشمانيّا في مستشفيات المحافظات موزعة على اجسام المصابين، كان فيها عدد الذكور المصابين 131 بنسبة (58.22 %) وعدد الاناث المصابات94 بنسبة (41.77%) ، وقد تفوقت اصابة الذكور على الاناث، وعند توزيع الخمج بين الاعمار نجد ان اعلى نسبة للذكور المصابين بـداء اللشمانيّا الجلدية كانت في الفئتين العمريتين (5-10) سنـة و (10-15) سنة حيث بلغتا 32 بنسبة (66.66%) و 34 بنسبة (54.83%) على التوالي ، ان هـذه النتائج متقاربة مــع ما توصل اليـه El-Gorban (1996) و Najim (1996) ، ربمــا يرجـع هذا الى مـيل الاطفـال للعب خارج المــنزل لاسيما الذكور الذين هم اكثر عرضة للخمج من الإناث (Sharifi, *et al*., 1998; WHO, 1984) .

وقد اختلفت نتائج الدراسة الحالية مع دراسة في تركيا Akcali *et al*., (2007) ; Mock and Nacy (1988) الذي اشار الى ان الاناث هم اكثر عرضه في الاصابة بالآفة الجلدية معزيا السبب في ذلك الى الظروف البيئية أو اختلافات الجنس كالاختلافات الهرمونية و الدفاعات

المناعية للمضيف حيث دعم هذه الفكرة من خلال ملاحظة ان الذي يحصل خلال عدوى اللشمانيا تتطور الاستجابة المناعية للـ Th1 عند قيامها بالدفاع المناعي وانتاج IFN-γ كوسيط نتيجة قيام الخلايا البلعمية macrophages بعملية القتل وانتاج اوكسيد النتريك nitric oxide لذلك اعتقد بان الذكور هم اكثر مقاومة للمرض لكون لديهم استجابة مناعية خلوية اقوى من الاناث (UL – Bari *et al* ., 2010) .

ايضا اوضح (1993) Sorachi *et al* أوضح أن بدء العدوى في انواع من الطفيليات ، وموقع الأنسجة المعنية و انواع المضائف تؤثر على داء اللشمانيا . وذكر Satoskar and Alexander (1995) أن العدوى الدونوفانية *L. donovani* أكبر في الذكور من الإناث في ، في حين لاحظ Giannini ,(1996) أن الإصابة المدارية *L. tropica* أكثر في الإناث . ومع ذلك، فإن التفاعل بين هرمونات الجنس مع الاستجابة المناعية معقدة ، والخلايا البلعمية Macrophages ، الخلايا القاتلة الطبيعية NK ، خلايا T تظهر تاثيرا، لمستقبلات هرمون الاستروجين، البروجستيرون و الاندروجين (Fox *et al*.,1996) ، وإضافة إلى الإنترفيرون γ ، فان نشاط وإنتاج1- IL ، 2- IL ، 3- IL ، 4- IL ، 5- IL ، 6 - IL و α - TNF تتغير بسبب هذه الهرمونات (Wang *et al*.,2003) .

وكشفت الدراسة الحالية أن أعلى معدل في كل من الجنسين سجل لدى البالغين في الفئات العمرية (5-10) و (10-15) سنة وهذه النتيجة كانت متفقة مع (2010),UL-Bari *et al*. الذي أشار إلى أن الأطفال الأكبر سنا على ما يبدو أكثر عرضة للخطر .

وأشارت دراسات أخرى إلى انتشار كبير لداء اللشمانيا الجلدي كالعدوى في مرحلة الطفولة في باكستان و سجلت دراسة في الهند الذي أجري في عام 2005 ان 63 ٪ من الحالات CL في الأطفال دون 12 سنة من العمر . وفي عام 2004 كشفت دراسة أخرى على داء اللشمانيا في الطفولة من تونس أن هذا المرض ظهر كوباء عند المرضى الذين تتراوح أعمارهم من 5 أشهر 15سنة (Shoaib *et al*.,2007). بينما سجلت أدنى نسبة في الفئة العمرية 10 وأقل مما قد يكون بسبب التعرض لهذه الفئة العمرية بالمقارنة مع الآخرين .

وعند اجراء دراسة لمعرفة تأثير نوع السكن في انتشار وبائية داء اللشمانيا الجلدية وجد ان النسبة ارتفعت وبفارق معنوي عال بين المناطق الحضرية Urban Regions 86 اصابة بنسبة (38.22%) ، والمناطق الريفية Rural Regions 139 اصابة بنسبة (61.77%) .

ان موقع الإقامة ومكان العمل، ووقت ظهور الآفات هي بيانات هامة لتحديد موقع الاصابة التي قد تحدث . فزيادة قابلية التنقل البشري والسفر لمسافات طويلة قد يسهم في انتشار داء اللشمانيا إلى المناطق غير المتوطنة بالمرض ، هذا وقد اصبح واضحا انتشار المرض في المناطق الحضرية بعد السفر إلى إيران . أيضا غالبا ما ترتبط ظهور داء اللشمانيا مع حركة الناس في بؤر الإصابة. على سبيل المثال خلال الحرب بين إيران والعراق ، لوحظ العديد من حـــالات داء اللشمانيا الجلدي بين الجنـــود المرابطـــين في بـؤر نشـطة للعدوى (Maraghi *et al*. , 2007).

وفيما يخـص عدد القرح فان معدل الاصابة بداء اللشـمانيّا الجلدية (CL) بـقرحة واحدة هي الاكثر نســبة (63.55%) . وقد تطـــابقت هذه النتـــائج مـع مـا توصل اليـــه Sharifi *et al*(1998) و Najim (1996) وان معدل الاصابة بقرحة واحدة هو الشائع بينما تتعارض مع ما توصل اليه Dondji (1998) في ان اغلب المرضى يحملون قرحتين ، وعزا وجود عدد من القرح إلى التعرض الى عدد من العضات بواسطة الحشرات المصابة ، وقد اشارت الدراسة عن انتشار قرح متعددة تكون أكثر تكرارا و مماثلة جزئيا إلى داء اللشمانيا الجلدي حيواني المنشأ (ZCL) والذي كان سببه *L. major* ومع ذلك ، فإنه مماثل لداء اللشمانيا الجلدي (anthroponotic (ACL في بعض الخصائص . وهذا يعني أن السمات السريرية والوبائية ليست شاملة تماما ، وينبغي ألا تعالج لمجرد نوع معين من CL ، أي ZCL أو ACL .

ان نمط النتائج السريرية في الدراسة الحالية لا تشبه تماما خصائص وصفها من ZCL . وهذه تشير إلى أن مظهر من مظاهر القرح قد لا تتوافق بالضرورة مع أنواع اللشمانيا والمظاهر السريرية وحدها قد تكون غير موثوق بها دون التشخيص المختبري لأنها تنتمي لأنواع جديدة من الطفيليات . ويمكن أن تعزى الاختلافات السريرية الى وجود التهابات مع نفس النوع الطفيلي بسبب الاختلاف الجيني وهذا السبب يقود الى التحريات الجزيئية للكشف عن طفيلي اللشمانيا بأنواعه كافة (Gangneux *et al* ., 2003) .

اما توزيع القرح الجلدية على اجسام المصابين فان النتائج دلت هذه على ان الوجه يتضمن اكبر عدد حيث بلغ 99 اصابة بنسبة (44%) تليه الاطراف السفلى 92 بنسبة (40.88 %) والاطراف العليا 33 بنسبة (14.66%) والجذع اصابة واحدة فقط بنسبة (0.44 %) .

تطابقت هذه النتائج مع نتائج (1998) Sharifi *et al* اذ اشاروا الى ان اغلب الخمج في الوجه ، وهذا قد يرجع الى تغطية اجسام الاطفال بالكامل مع بقاء الوجه معرضاً لوخز ذبابة الرمل خوفا عليهم من التغيرات الفصلية خلال فصلي الربيع والخريف (Dondji *et al*.,1998; Ardhali *et al*.,1997) .

اظهرت الدراسة ان الفرق المعنوي واضح P< 0.01 بين نسبة النوع الرطب 179 (79.55%) والنوع الجاف 46 (20.44%) ويمكن ان يعزى هذا الى العوامل المسببة لها والى وجود عدوى ثانوية تعطي الشكل التقرحي للآفة . وكانت النتيجة الحـــالية بما يتفق مــع Qader *et al* (2012) و Al- Mashhadany (2002) في العراق ، الذي ذكر هذا النوع الرطب أكثر معروفا من النوع الجاف . ولكن نتيجة مختلفة قد تم تسجيلها من قبل Hashemi *et al*(2010) الذي أشار الى أن هذا المرض كان أكثر شيوعا في المناطق الحضرية في العراق . ان ارتفاع عدد حالات المرض في المناطق الريفية يمكن تفسيره بسبب التعرض للناقل والمضائف الخازنة ، وهي تعتبر العوامل المسببة للمرض في هذه الاماكن المتوطنة .

ان تشخيص انواع اللشمانيا تعتمد على الفحص المجهري للمسحات المصبوغة بصبغة كمزا والعينات الطفيلية التي تعزل من الآفات الجلدية من المرضى المشتبه اصابتهم بـ CL وزرعها مباشرة على الاوساط الزرعية شبه الصلبة و NNN و تاكيد تشخيص هذه العزلة تعتمد على نشاط الطور السوطي (المتحرك) ، وهذا يتفق مع Chunge *et al* (1989) الذي اوضح ان تشخيص داء اللشمانيا تعتمد على الكشف عن amastigotes بعد التطبيع من نخاع العظم أو الطحال المأخوذة من الحالات الحشوية أو عينات الخزعة المأخوذة من الأنسجة المصابة في الزرع . وهذه الطريقة تفقد حساسيتها بسبب قلة طفيليات اللشمانيا في بعض العينات او قد تكون الطفيليات هزيلة وخارج الخلية في الغالب في بعض الابحاث التشريحية ، أو تواجه مشكلة التلوث ، ذكـر(2006) Bensoussan *et al* أن نجاح التشخيص المجهري لتحديد طور amastigotes في التحضيرات الملونة تختلف تبعا لعدد الطفيليات و خبرة الشخص الذي يقوم

بفحص الشريحة. كما ان مدة الحضانة طور الـ promastigot في المزرعة تتراوح من 2-7 يوم وفيها قد يفقد الطفيلي عدده او يقل اضافة الى تعرضه الى التلوث .

تتصف تقنية PCR بدقتها العالية نظراً لنوعية القواعد المستخدمة في التفاعل والتي ترتبط في مكان محدد من DNA المدروس، كما تتميز هذه الطريقة بحساسيتها المرتفعة ، حيث تسمح بالكشف عن أعدادٍ قليلة جداً من الطفيلي ويمكن إنجازها ،(كما هي الحال في هذه الدراسة) ، على كمية قليلة جداً من DNA المستخلص (بحدود 50 نانو كرام). ولقد اعتمدت بعض الدراسات على هذه التقنية للكشف عن داء اللشمانيا الحشوي، بتحليل عينات من الدم المحيطي رغم احتوائها على عددٍ قليل من الطفيليات (Da Silva *et al*., 2004 ;Deborggraeve *et al* ., 2008).

ويعد PCR تفاعلاً سريع في حال توفر المواد والأجهزة اللازمة. ومجمل هذه الصفات تجعل منه تفاعلاً يتفوق على كل الطرق التقليدية المستخدمة في تحديد نوع الطفيلي. إذ تعد التفاعلات المصلية أو المناعية ، وخاصة باستخدام الأضداد وحيدة النسيلة منخفضة النوعية نظراً للتشابه الكبير في الكثير من المستضدات العائدة للأنواع المختلفة للطفيلي ، مما يؤدي إلى حدوث تفاعلات تصالبية تعطي نتائج تنميط غير دقيقة. بينما يعد الترحيل الكهربائي عديد المواقع أو ما يعرف بالترحيل الكهربائي الأيزوإنزيمي أكثر دقة من الطرق المصلية والمناعية في تعيين نوع الطفيلي (De Lima *et al* ., 2010) .

نظراً لوجود اختلافات في التعبير الجيني الكمي والنوعي وفي بنية المستضدات بين أنواع طفيليات اللشمانيا المختلفة، وبالتالي في نمط الاستجابة المناعية المحرضة تجاهها، يُعد تعيين نوع الطفيلي المسبب للإصابة ضرورياً في الدراسات البحثية والتطبيقية التي تهدف إلى تطوير استراتيجيات تلقيحية ناجحة (Brobey *et al* ., 2006; Rohousova *et al* ., 2005). كما تجدر الإشارة إلى أن تعيين نوع الطفيلي خطوةً أساسية قبل القيام بأي نوع من الدراسات الجزيئية والمناعية والكيميائية الحيوية التي يمكن أن تجرى لاحقاً على هذه السلالات. كما أنه مهم في التشخيص السـريري للمـرض وذلك لاخـتيار أسـلوب المعالجة الملائم والأكثر نوعية (Navin *et al*.,1992).

اجرى العديد من الباحثين تشخيص جزيئي باستخدام هذه التقنية مؤكدين الحساسية العالية في التشخيص بهذه التقنية (Motazedian *et al*., 2002 ; Safaei *et al* ., 2002 ; Maraghi *et al* .).

وباستعمال تقنية PCR أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن العزلات المدروسة تنتمي بعضها لنوع اللشمانيا المدارية *L.tropica*، والنوع الاكبر منها ينتمي الى اللشمانيا الكبرى *L. major* مما يشير إلى أن هذا النوع هو المسبب الرئيس للإصابة بالداء الجلدي في منطقة الدراسة. تتوافق هذه النتائج مع ما توصلت إليه دراسة أشارت إلى الانتشار الكبير للشمانيا الكبرى بالنسبة للأنواع الأخرى من اللشمانيا .(Baldwin *et al.* , 2004) .

2-5 دراسة داء اللشمانيا الجلدية في محافظة كربلاء المقدسة

تظهر الحالة المرضية بداء اللشمانيّا الجلدية مع بداية الخريف وفي اشهر الشتاء وهذه تتطابق مع ما حصل عليه Rahim&Tatar (1966) و Tayeh *et al* (1997) وربما ترجع هذه النتائج الى نشاط ذبابة الرمل والظروف البيئية الملائمة لها ولا سيما ما يتعلق بدرجات حرارة المحيط (Talari *et al* ., 2009)

وكما اظهرت النتائج ان النوع الاكثر انتشارا في المحافظة من اجناس اللشمانيا هي اللشمانيا الكبرى *L. major* اذ اعطت نسبة مئوية اعلى مما هي في اللشمانيا المدارية *L.tropica* مع تفوق الذكور على الاناث في كلا النوعين واتفقت هذه النتائج مع دراسة Giannini(1996) .

3-5 الدراسة المناعية للمرضى المصابين بداء اللشمانيا الجلدية في محافظة كربلاء المقدسة

مستويات الكلوبيولينات المناعية الكلية IgG وIgM لدى المصابين بطفيلي اللشمانيا الجلدية بتقنية الاليزا (ELISA)

هناك العديد من التقنيات لتشخيص الامراض وتراكيز الاجسام المضادة في امصال المصابين ، وكل تقنية سجلت عليها ملاحظات سلبية بدءاً بالعزل الجرثومي حيث أشار الباحث Cassataro *et al* (2005) الى عدم عزل الجرثومة في الحالات الحادة عند وسط فترة تجرثم الدم .

حيث أشار العديد من الباحثين الى أهمية فحص الاليزا لتشخيص الامراض إذ انه يحدد طور المرض سواء إن كان مزمن أو حاد ففي دراسة مقارنة أجراها الباحثون لاحظوا إن فحص الاليزا أكثر حساسية من فحص التلازن الانبوبي حيث إن الأخير لا يميز بين الإصابات الحادة و المزمنة في حين إن فحص الاليزا مناسب لتشخيص حالة المرض من خلال تشخيص نوع

الاميونوكلوبيولين وهو فحص حساس لتحديد IgG أو IgM إذا استعملا معا، حيث اظهر نتائج متوافقة مع فحص التلازن الأنبوبي و ممكن اعتماده لتشخيص المرض في الإنسان ويؤدي الى أفضل النتائج ذات العلاقة بالعلامات السريرية (AL-Bashir and Ali, 2003).

اشارت النتائج الى ارتفاع معدلات قيم الاميونكلوبيولين (IgG وIgM) في امصال المرضى المصابين باللشمانيا الجلدية بنوعيها (الكبرى والمدارية) ، وقد يعود سبب هذا الارتفاع الى تنشيط polyclonal لخلايا B وهذا بسبب تحفيز مستضدات اللشمانيا التي تحفز نمو وتمايز proliferation and differentiation خلايا B وتحولها الى خلايا بلازمية plasma cells تفرز الاجسام المضادة ، ايضا السايتوكينات المفرزة من الخلايا كخلية T – helper والمسؤولة عن تنظيم عوامل بدأ التنشيط لخلايا B ، الانترفيرون – كاما Interferon-γ يفرز اولا من خـــلايا Th1 لتحـــفيز تثبيت المتمم للاجسام المضادة IgG2 and IgG3 . (Snapper & Paul, 1987) .

في حين ان سايتوكينات خلايا Th 2 وهي IL - 4 and IL – 5 شخصت كمساعدات لخلايا B اللمفاوية وتحفيز انتاج مستويات عالية من IgE و IgM والمتمم غير المثبت للجسم المضاد البشري IgG4 (Abbas *et al*., 1996) .

أدى العلاج الى التقليل من قيمة متوسط الكلوبيولين المناعي IgM و IgG ، حيث كانت قيمتها أعلى من مجموعة السيطرة ، وهذه النتيجة تتفق مع Taher (2006) الذي اشار الى أن زيادة مستويات الأجسام المضادة للشمانيا قد تكون موجودة لفترة طويلة بعد العلاج .

4-5 مستويات السايتوكينات Cytokine levels

في معظم الامراض الطفيلية تقدم الاستجابة المناعية الخلوية Cellular Response (Th1) او الخلطية Humeral Response (Th2) السيطرة الافضل على مسببات الامراض ، ان استجابة الخلية المساعدة ضروري في تحديد رد الفعل المناعي الناجح ، وان لخلية Th 1 وسائط مؤثرة في الحساسية المتأخرة DTH وافراز الانترليوكين -2 (IL – 2) وانترفيرون- كاما (IFN – γ) ، فهي مؤثرات رئيسية في المناعة التي تتوسطها الخلايا cell – mediated immunity (Perez *et al*., 1995) .

وبالمقابل فان خلية Th 2 لا تنقل للـ DTH لكنها تنتج IL - 4، IL - 5، IL - 6 و IL - 10 وتتـــعاون مع خلية B لتوليـد الكلوبولين المناعي، IgA، IgG و IgE (Finkeleman *et al*., 1990) .

وادت مستويات IL - 10 التي حصل عليها (2001) Margaret & David التي ذكر فيها ان المرضى المصابين باللشمانيا تصل الزيادة عندهم في افراز IL – 10 لدرجة تثبيط تنظيم استجابة خلايا T . ان الاصابة باللشمانيا الجلدية معروفة بحثها على الافراز الداخلي للانترليوكين - 10 كميكانيكية للتطفل وذلك لان IL – 10 يبدو انه مسؤول عن تثبيط صناعة الانترفيرون – كاما ((IFN – γ) السايتوكين الرئيسي المحفز للخلايا الملتهمة macrophage ويشترك في الدفاعات ضد اللشمانيا والذي يسهل بقاء الطفيلي حيا داخل الخلايا وذلك من خلال تثبيط الاستجابة التأكسدية والالتهابية (Bhattachary *et al*., 2001) .

وفي الحقية فان شده ضراوة طفيلي الليشمانيا في الانسان ترتبط بشكل وثيق مع زيادة مستويات IL – 10 لذلك تستخدم الاجســـام المضادة التي تعمل على منع نشاط IL – 10 او منع مستقبلاته والذي قد يكون اسلوباً فعالا في علاج داء اللشمانيا (Murrary *et al*., 2002).

تم الكشف عن مستويات عالية من الانترفيرون – كاما (IFN – γ) في مصل المرضى المصابين باللشمانيا الجلدية CL مقارنة مع السيطرة . ان المستويات العالية من (IFN –γ) ضرورية للحفاظ على التوازن بين استجابة كل من Th1 و Th2 . هذه النتائج جاءت مطابقة لباحثين سابقين ، Gomes and Dos (1998) اللذان وجدا بان التوازن بين نوعي الاستجابة Th1/Th2 مهم في تفعيل الاصابة في داء الليشمانيا سواء كانت الاصابة حادة او مزمنة .

لاحظ Kemp andT Theander (1999) بان الارتفاع الملحوظ لكل من IL – 10 و IFN γ– موجود في المصابين باللشمانيا الجلدية .

اشارت دراسات في امريكا على اللشمانيا الجلدية CL الى ان IL – 2 و IFN –γ تنتج عند غياب التحـــفيز بانتـــجينات اللشـمانيا . لاحـــظ (Bogdan and Rollinghoff (1996 ان IL – 10 اوقف تنشيط Th1 وبالتالي الاستجابة السمية من خلال تثبيط تنظيم انتاج IL-12 و IFN –γ وان IL-10 ايضا يثبط تنشيط الخلايا الملتهمة Macrophage ويقلل من قابلية هذه الخلايا في قتل اللشمانيا .

ان الكثير من البيانات دعمت بحقائق مثيرة للاهتمام حول الخلل في التوازن بنسبة Th1:Th2 باتجاه سيادة استجابة Th2 في مجموعة المصابين بـ CL ، واخذت بنظر الاعتبار مستويات IL – 10 و IFN –γ ، حيث لوحظت نسبة عالية من IFN- γ /IL – 10 . ان انخفاض مستوى IL – 10 يتبع فترة العلاج واكتشاف IFN – γ في الحالات الحادة وعند المرضى المعالجين سجلت ايضا . وهكذا اقترح بان وجود IL – 10 اكثر من غياب IFN- γ هو من صفات الاصابة باللشمانيا (Ghalib *et al.* , 1993) .

واخيرا فان مفهوم Th1/Th2 لايمكن حسابه بشكل تام وكامل بسبب التعقيد الحقيقي داخل الكائن الحي (*in vivo*) حيث ان بقاء الطفيلي حيا يعتمد على ميكانيكيات مختلفة بدلا من الفكرة العامة لتجاهل نوع من انواع الاستجابة سواء Th1 او Th2 . وان الفشل في السيطرة او ايجاد الحلول للامراض المعدية غالبا ما تكون نتائجه غيرملائمة والاهم من ذلك الاستجابة المناعية الكافية (Powire and Coffman, 1993) .

5-5 تأثير لقاح المستضد اللشماني المنقى Lipophasphoglycan (LPG) في الحيوانات المختبرية

استعملت الفئران في هذا الجزء من الدراسة، لتقييم الاستجابة المناعية ، ويمثل نموذج الفأر بدائل منافسة لأسباب عديدة : منها انها أقل تكلفة ويمكن استخدامها في أي مختبر مع السيطرة على التلوث الميكروبيولوجي وسهولة ترتيب البيوت الأساسية بالنسبة للفئران . وكانت الحيوانات المستخدمة جميعها من الذكور لكونها تكون اكثر استعدادا للاصابة بطفيلي اللشمانيا من الاناث ولقد تم مراعاة العمر ايضا (Stauber ,1970) .

وقد تم ترتيب البيوت الخاصة بمعيشة الفئران المختبرية وضبط درجة الحرارة الثابتة تقريبا (20-25) وذلك لتأثيرها على سير الخمج (Ashford and Bates , 1998)

حضر اللقاح بتنقية المستضد الرئيسي (LPG) في طور امامي السوط (Promastigote) والذي هو الطور المعدي للمضيف الفقري ، حيث يعد هذا المستضد احد مسببات الضراوة لطفيلي اللشمانيا الجلدية ومن هذا المنطلق استخدم ليكون كلقاح من بين عدد من الجزئيات السطحية للطفيلي التي تثير استجابة مستضدية عند دخولها للمضيف والتي تعد عوامل ضراوة ايضا ، وقد

حضر بعد التنقية بطريقة مناعية كيميائية لغرض حقنه في الحيوانات قيد الدراسة والتي قسمت الى مجموعتين حسب نوع اللشمانيا (*L.tropica* و*L. Major*) فضلا عن السيطرة .

بينت النتائج الاحصائية الى وجود فروق معنوية للمجموعة الاولى والثانية ومجموعة السيطرة في اختبار التحول اللمفاوي ، واختبار فرط الحساسية المتأخر وفحص البلعمة حيث تفوقت المجموعة الثانية (*L. Major*) في اعطاء استجابة مناعية في كل من الاختبارات المذكورة اي ان المستضدات السطحية في هذا النوع من الطفيلي تثير استجابة الخلايا التائية ضد الطفيلي من خلال شدة تفاعل فرط الحساسية المتأخر (Belkaid, *et al*., 2002) .

وقد كانت نتائج اختبار فرط الحساسية المتاخر وفحص البلعمة مشابهة لاختبار التحول اللمفاوي ، من حيث قابلة اللقاح على تولد تفاعل موجب لفرط الحساسية المتاخر وتحفيز البلاعم على الالتهام .

وجاءت هذه النتائج مطابقة لنتائج (Castes *et al*., 1999) الذي اكد ان الطور امامي السوط promastigote مع لقاح BCG ينتج عنه تحفز الاستجابة المناعية وذلك من خلال قابلة الخلايا اللمفاوية على التحول والانقسام ومن خلال شدة تفاعل فرط الحساسية المتأخر بمستضد اللشمانيا . حيث حفز اللقاح الخلايا التائية المساعدة النمط الأول Th1 والتي تفرز كل من الانترفيرون كاما و IL-2 والعامل المنشط للبلاعم MAF والتي تتوسط عملية تنشيط وتجميع البلاعم داخل وخارج الحي بالإضافة الى كون هذه الخلايا ترتبط مع التفاعل الموجب لفرط الحساسية المتأخر

ان الطفيليات التي تثير مستضداتها السطحية مستوى عال من تحسس الخلايا التائية (وهذا واضح من خلال التحول اللمفاوي) والتي بدورها تفرز كل من انترفيرون نوع كاما والعامل المنشط للبلاعم وانترليوكين -2 والتي تتوسط عملية تنشيط وتجميع الخلايا البلعمية داخل وخارج الحي (وهذا واضح من خلال فحص البلعمة) بالاضافة الى ان هذه الخلايا اللمفاوية التائية المتحسسة تتوسط في تفاعل فرط الحساسية المتاخر والذي كان اشد في المجموعة الثانية قيد الدراسة والتي تميزت بارتفاع نسبة الخلايا المتحولة (Sadick *et al.*, 1986; Cox ,1997 ; Bogdan and Rollinghoff,1996 ; Fiorentino *et al.*,1991)

الاستنتاجات

1- التقنيات الجزيئية هي وسيلة يمكن الاعتماد عليها لتشخيص وتحديد أنواع الليشمانيا، ويمكن تطبيقها في التحقيقات الوبائية .

2- كل من اللشمانيا الجلدية الكبرى *L. major* والمدارية *L. tropica* من العوامل المسببة لداء اللشمانيا الجلدي في المحافظات الوسطى والجنوبية وان *L. major.* هو من الانواع الرئيسية المسببة لداء اللشمانيا الجلدي مقارنة بالنوع *L. tropica* في هذه الدراسة

3- ان تقنية ELISA من الاختبارات الحساسة والنوعية لتشخيص CL وممكن استعمال العدة الخاصة فيها لطيف واسع من التطبيقات وبكلفة اقل .

4- قيست مستويات عالية من IL-10, IFN-γ في امصال المرضى المصابين بـ CL في محافظة كربلاء ، ثم تنخفض بعد العلاج الى ان تصل الى مستوياتها الطبيعية .

5- يمكن عد اختبار فرط الحساسية المتأخر واختبار التحول اللمفاوي ومعدل نسبة الخلايا الملتهمة مؤشرات للاستجابة المناعية ضد الخمج باللشمانيا في الحيوانات الممنعة .

التوصيات

1- استخدام تقنيات جزيئية متقدمة مثل تفاعل البلمرة المتسلسل ذو الزمن الحقيقي Real time - PCR لدراسة تتابعات الحامض النووي DNA-sequencing لدراسة التوصيف الجزيئي للانواع المختلفة المسببة لداء اللشمانيا في العراق .

2- توجيه الدراسة الى استخدام بعض العوامل المساعدة Adjuvant المستعملة مع لقاحات اللشمانيا وتحديد التراكيز التي تحفز الحد الاعلى من استجابة الخلايا المناعية المساعدة (Th1) بعدها الخلايا المسؤولة عن المناعة الواقية ضد خمج اللشمانيا .

3- تحديد جزيئات ومستضدات اخرى (المستضدات السطحية) للطفيلي كالبروتين السكري الرئيسي في السطح Gp63 التي لها الاستعمال المحتمل كلقاح للإنسان .

المصادر العربية :

1- الآلوسي، رجاء سليمان (1979) . دراسة احتمال أكثر من ضرب لطفيلي Leishmania tropica في العراق . رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة بغداد .

2- التميمي ، عبد الكريم عاكول ربيع (1990) . دراسة التغيرات المرضية والاستجابة المناعية لعزلات طفيلي اللشمانيا في الحيوانات المختبرية . رسالة ماجستير ، كلية الطب البيطري ، جامعة بغداد .

3- السعدي، احمد عبد الأمير وطاهر، جاسم حميد (1990). الطفيليات ومرض البشر. دار الحكمة للطباعة والنشر، جامعة الموصل.

4- الشنوي ، فوزية أحمد (1975) . مقارنة الاصابة المختبرية في بعض القوارض العراقية والحيوانات المختبرية بضرب من طفيلي الحمى السوداء L. donovani . رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة بغداد.

5- المرسومي ، هدى ظاهر هذال (1995) . دراسة التغيرات النسيجية الامراضية والاستجابة المناعية لعزلات طفيلي اللشمانيا الحشوية في الحيوانات المختبرية . رسالة ماجستير ، كلية العلوم ،جامعة بغداد ص 89.

6- النجار ، عمر غسان (2002) . استخدام طفيليات اللشمانيا الجلدية المقتولة بالأشعة الجيمية او الاشعة فوق البنفسجية كلقاح ضد الاصابة باللشمانيا الجلدية . رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة بغداد ، صفحة 85 .

7- الورد ، حارث سعيد جعفر (2001) . دراسة الاستجابة المناعية الناتجة عن استخدام خلايا اللشمانيا الجلدية المقتولة كلقاح ضد الخمج في الهامستر الذهبي ، رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة بغداد .

References

- Abbas , A. K. ; Murphy, K. M. and Sher , A. (1996) . Functional diversity of helper T - lymphocytes . N*ature*, 383 : 787 – 793 .
- Abdalla, N. ; Eldosh, A. ; Abdulgani, A. ; Yusif, B. and Magzoub, M. (2003). Typing and Characterization of *leishmania* sub-clinical isolates from Nuba Mountain, West of Sudan. Infection Genetic and Evolution , 2 (4) :277.
- Abdullah, M. ; Mushriq , K. and Tural, Y. (2012). Identification of Leishmania paracites in clinical samples obtained from cutaneous Leishmania patients using PCR technique in Iraq . *Iraqi .J.Sci*., Vol. 50(1) :32 – 36.
- Adini , I. R .L ; Jacobson , M. ; Kasap, Y. ; Schlein and C. L. Jaffe . (1998) .Species –specific detection of Leishmania in sand flies using an enzyme –linked immunosorbent assay . *Roy .Soci. of Tro. Med . And Hyg .*, 92 : 35 -37.
- Adler , S. and Theodor, O. (1930) . Investigation on Mediterranean Kala – azar IX. Feeding experiments with P. pernicous and other species on animals infected with L . infantum *Proc. Roy . Soc. London* . B., 116: 505 -515 .
- Akcali, C. ; Culha, G. and Inaloz, H.S. (2007). Cutaneous Leishmaniasis in Hatay. *J. Turk. Acad .Dermatol* ., (1):1-5.
- AL - Bashir , N. M. T. and Ali , S. H. (2003) : The use of urine as a sample for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Iraqi .J .Sci*., 2 (3) : 323 - 338 .
- AL- Aubaidi , I. Kasim. (2007). Effect of some plant extracts on growth and viability of cutaenous and visceral Leishmania parasites

in vitro and *in vivo*. A thesis of Ph.D., College of education Ibn Al-Haitham, University of Baghdad, Baghdad, Iraq.

- Al- Barwarie , S.E. R. ; Al- Alousi and Zaia, M. (1985). Histopathology of Cutaneous Leishmaniasis in hamster following incubation with a human isolate of Leishmania tropica. *J. Fac. Med. Baghdad* , (27) 3 : 31 - 41 .
- Al-borzi, A.; Rasouli, M. and Shamsizadeh, A.(2006). Leishmania tropica-isolated patient with visceral Leishmaniasis in southern Iran. *Am. J. Trop. Med. Hyg* .,(74):306–307.
- Alder ,S. and Theodor ,O.(1930) The inoculation of canine Cutaneous Leishmaniasis into man and behavior of various straines of Leishmanian .*Mic. Ann. Trop. Med . parasitol* ., 197 -210
- Alexander, B. ; Usma, Mc ; Candena .H ; Bl. Quesada ; Solarte , y.; Roa, w. and Travi, W. Bl. (1995). Evaluation impregnated bendents and cutains against Phlebotomine Sand flies in Valle del Cauca .Colombia . *Entomol* ., 279 -283.
- AL-Hucheimi, S.(2005). Acomportive study of some methods used for cutaneous Leishmaniasis.MSc. Thesis,AL-Kufa Univ.
- Al-Hussayni , N.K ; Rassam , M.B. ; Jawdat, S.Z. and Wahid ,F.N. (1987) . Numerical taxonomy of some Old World Leishmania species. Trans. *Roy. Soc. Trop .Med. Hyg* ., 81: 581 – 586.
- Ali, N. and Afrin , F. (2007). Protection of against Leishmania parasite by immunized with promastigote antigen incorporated in liposomes. J. *Parasite*, 83(1): 75-77.
- Al-Mashhadany, W. (2002). Present status of cutaneous Leishmaniasis and its vectors in Baghdad area. M.SC. Thesis, College of science, university of Baghdad.

- AL-Obaidi, H.S. (2000). Microbiological and Pharmacological studies with a Trial of vaccination against cutaneous Leishmaniasis. PhD Thesis submitted to Collage of Medicine, University of Tikrit . Tikrit, Iraq.
- Al-Samara, M. A. and Al-Obaidi S. H. (2009). Cutaneous Leishmaniasis in Iraq Infect Developing Countries. Tikrit University College of Medicine , Tikrit , Iraq , 3 (2) :123-129.
- Appelberg , R. (2007) . Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing . Trends Microbiol , 15: 87–92.
- Aransay, A. ; Scoulica, E. and Tselentis, Y.(2000). Detection and identification of Leishmania DNA within naturally infected sandflies by seminested PCR on minicircle kinetoplast DNA .*Appl. Environ. Microbiol* , 66(5) :1933-1938.
- Ardhali , S.S . ; H. Motazadian ; Aflatonian , M. R. ; Fekri , A. R . ; Ahmadi , M. R. ; Nadim , A. ; Khamesipour , A. ; Dowlat, Y . and Modabber, F.(1997). Identification and characterization of Leishmania isolated school children in Bam. Iranian .*J. Med. Sci* ., 22 (3) : 82 -88.
- Armijos , R.X. ; Weigel, M.M. ; Calvopina, M. ; Hidalgo, A. ; Cevallos, W. and Correa , J . (2004). Safety, immunogenicity and efficacy of an autoclaved Leishmania amazonensis vaccine plus BCG adjuvant against new world cutaneous leishmaniasis. Vaccine , (22) : 1320-6 .
- Asgari, Q. ; Motazedian, M.H. ; Mehrabani, D. ; Oryan, A. ; Hatam, G.R. ; Owji , S.M. and Paykari , H. (2007) . Zonotic cutaneous Leishmaniasis in Shiraz Iran: a molecular, isoenzyme and morphologic approach. *J .Res .Med .Sci*., 12: 7–15.

- Ashford , R.W. and Bates , P.A. (1998) . Leishmania in the old World in : Cox, F. E. G. editor. Microbiology and microbial infections. Arnold . London , (5): 215-240 .
- Azizi, K. ; Davari, B. ; Kalantari, M. and Fekri, S. (2011). Gerbilid rodents fauna (Muridae: Gerbilinae) and detection of reservoir hosts(s) of zonotic cutaneous Leishmaniasis using a nested-PCR technique in Jask city in Hormozgan Province in 208. Sci .J .Kurdistan. *Univ. Med .Sci* ., 16: 6–76.
- Baldwin, T. ; Henri , S. ; Curtis , J. ; O'Keeffe , M. ; Vremec , D. and Shortman , K. (2004). Dendritic cell populations in Leishmania major-infected skin and draining lymph nodes. Infect Immun . Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Melbourne, Victoria Australia , 72 (4) :1991-2001.
- Bates, P.A. and Rogers , M. E. (2007). New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of Leishmania. Curr. *Mol. Med* ., (4): 601-9.
- Behin, R. and Mauel, J. (1987). Leishmania tropica pathogenicity and *in vitro* macrophage function in strains of in bred mice. *Exp* . *parasitol* ,48,81,91.
- Belkaid , Y. ; Hoffmann , K .F ; Mendez , S. ; Kamhawi , S. ; Udey , M.C. ; Wynn, T. A . and Sacks, DL . (2001) . The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of Leishmania major in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure . Journal of Experimental Medicine , 194: 1497-1506.
- Belkaid, Y. ; Piccirillo, C. A . ; Mendez, S. Shevach, E.M. and Sacks, D. L. (2002). CD4+CD25+ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity. *Nature*, 420: 502-507.

- Bensoussan, E.; Nasereddin, A. ; Jonas, F. ; Schnur, L.and Jaffe, L. (2006). Comparison of PCR Assays for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis, *J. Clin. Microbiol*., 44(4): 1435–1439.
- Berman , J. D . (1988). Chemotherapy for Leishmaniasis . Biochemical mechanisms . clinical efficacy and future strategies. View. *Infect. Dis* ., 10 (3) : 560 – 581.
- Bhattachary , S. ; Ghosh , S. and Majumdar , S. (2001) . Immunodulatory role of interleukin - 10 in visceral Leishmaniasis . defective activation of protein kinase C - mediated signal transduction events . Infection and immunity , 69 : 1499 - 1507 .
- Blander, S.J. and Horwitz, M. A.(1991).Vaccination with the major secretory protein of Legionella induces humoral and cell-mediated immune responses and protective immunity across different serogroups of Legionella pneumophila and different species of Legionella. *J. Immunol* ., 14 (7):285–291.
- Bogdan , C. and Rollinghoff, M. (1996). The Impact of the type 1 and 2 T-Helper cell concept on novel vaccine Design with Emphasis on protection Against Leishmania parasite .in Kaufmann, S. H. editor .concepts in vaccine Development. Walter de Gruter . Bertin. New York , 205-240 .
- Bogdan , C. and Rollinghoff , M. (1998) . The Immune response to Leishmania . Mechanisms of parasite control and evasion. *Int. J. Parasitol* , 28: 121 -143.
- Brobey, R. K ; Mei F.C ; Cheng X. and Soong , L. (2006). Comparative two-dimensional gel electrophoresis maps for promastigotes of Leishmania amazonensis and Leishmania major. *Braz. J. Infect. Dis* ., 10 : 1-6.

- Bustin, S. A. (2002) . Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol. Endocrinol*, 29: 23−39.
- Caceres, A. G. ; Villaseca, P. ; Dujardin, J. C. ; Banuls, A.L. ; Inga, R. and Lopez, M. (2007). Epidemiology of Andean cutaneous leishmaniasis: incrimination of Lutzomyia ayacuchensis (Diptera: psychodidae) as a vector of Leishmania in geographically isolated, upland valleys of Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. Instituto Nacional de Salud, Lima, Peru. 70 (6): 607-612.
- Caceres-Dittmar, G.; Tapia, F. J.; Sanchez, M. A.; Yamamura, M.; Uyemura, K. ; Modlin, R. L. ; Bloom, B.R. and Convit, J. (1993). Determination of the cytokine profile in American cutaneous Leishmaniasis using the polymerase chain reaction. Clinical ansnapperd Experimental Immunology, 91: 500-505.
- Cassataro, J. ; Estein , S . M . ; Pasquevich , K. A. ; Velikovsky, C. A. ; Barrera, S. ; Bowden, R. ; Fassati, C.A. and Giambartolomei, G.H. (2005). Vaccination with the recombinant Brucella outer membrane protein 31 or a derived 27-amino-acid synthetic peptide elicits a CD4+ T helper 1 response that protects against Brucella melitensis infection .. *Infect. Immun* ., 73(12):8079-8088.
- Castes, M. ; Blackell , J. ;Trujillo , D. and Formica.(1999). Immune response in heltyh volunteers vaccinated with killed Leishmania promastigote plus BCG1 : skine test reactivity , T-cell proliferation and interferon- production . *vaccine,* 12(11): 1041-1051 .
- Centers for Disease Control and Prevention .CDC. (2009). Update. Cutaneous Leishmaniasis in U.S. military personnel Southwest . Central Asia, 2002–2009. *MMWR . Morb . Mortal .Wkly .Rep* ., (53): 264–265.

- Chakkalath, H.R. ; Theodos, C.M. ; Markowitz, J.S. ; Grusby, M. J .; Glimcher , L.H. and Titus , R.G. (1995). Class II major histocompatibility complex deficient mice initially control an infection with Leishmania major but succumb to the disease. *Journal . Inf. Dis*., 171: 1302- 1308.
- Chan-Bacab, M. and Pena-Rodriguez, L. M. (2001). Plant natural products with Leishmanicidal activity. *Nat. Prod. Rep*., 18 : 674 – 688.
- Chaudhuri, G.; Chang, K.P. (1988) . Acid protease activity of a major surface membrane glycoprotein (gp63) from Leishmania mexicana promastigotes. *Mol. Bioch. Parasitol* ., 27:43-52.
- Chen, G. ; Darrah, P. A. and Mosser, D. M. (2001). Vaccination against the intracellular pathogens Leishmania major and Leishmania amazonsis by directing CD40 ligand to macrophages. *Infect. Immun*., 69 (5) : 3255 – 3263.
- Chunge, C. N. ; Ngige, S.; Bwibo, C. R. A. ; Mulega, P. C. ; Kilonzo, J. F. ; Kibati , F. and Owate , J. (1989). A rapid staning technique for Leishmania parasite in spleenic aspirate smear. *Ann. Top. Med. Parasitol* , 83(4): 361-364.
- Cox, F. E. G.(1997). Designer Vaccines for Parasitic Diseases . *Int. J. P. arasitol* ., 27(10) :1147-1157.
- Cruz, I. ; Morales, M. ; Noguer, I. ; Rodríguez, A. and Alvar, J. (2002). Leishmania in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet* , 359: 1124-25.
- Da Silva, E. S; Gontijo C. M; Pacheco Rda, S. and Brazil, R. P (2004). Diagnosis of human visceral Leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. *Genet Mol. Res*. 3, 251-257.

- Dabirzadeh, M. ; Mirmohammad, H. ; Baghaie, M.and Hejazi , H. (2012).Genetic polymorphism of Leishmania major in two hyper endemic regions of Iran revealed by PPIP - PCR and ITS - RFLP. *Archives Iranian Med* ., 15(3): 151-156.
- Davami , Mh. ; Motazedian , MH. ; Kalantari , M. ; Asgari , Q. ; Badzohre, A. and Mohammadpour , I. (2011) First microscopical and molecular-based characterization of Leishmania major within naturally infected Phlebotomus salehi (Diptera ; Psychodidae) in Fars province, southern Iran. *Ann. Trop. Med. Parasitol* ., 105(7):485-91.
- Davami, M. H. ; Motazedian, M. H. ; Sarkari, B. (2011) .The changing profile of cutaneous Leishmaniasis in a focus of the disease in Jahrom district, southern Iran. *Ann .Trop .Med .Parasitol*, 104: 377–382.
- Dawson, R. M. ; Elliot, D. C. Elliot, W. H. and Jones, K. M. (1969) .Data for biochemical research . Clareden Pree. Oxford , 508-600 .
- De Lima, A . C. ; Zampieri R. A. ; Tomokane T.Y. ; Laurenti M. D. ; Silveira, F.T. ; Corbett , C.E. ; Floeter – Winter, L. M. and Gomes , C. M. (2010). Leishmania sp. identification by PCR associated with sequencing of target SSU rDNA in paraffin-embedded skin samples stored for more than 30 years .*Parasitol. Res* .,
- De -Lima, H. ; Rodríguez, N. ; Barrios, M. A. ; Avila, A. ; Cañizales, I. and Gutiérrez, S. (2008). Isolation and molecular identification of Leishmania chagasi from a bat (Carollia perspicillata) in northeastern Venezuela. Mem .*Inst. Oswaldo .Cruz* , 10(34): 412-4.
- Deborggraeve, S. ; Boelaert, M. ; Rijal, S. ; De Doncker, S. ; Dujardin, J. C.; Herdewijn, P. and Buscher, P. (2008) .Diagnostic accuracy of a new Leishmania PCR for clinical visceral Leishmaniasis

in Nepal and its role in diagnosis of disease. *Trop. Med. Int . Health* , 13: 1378-1383.

- Dillom, R. J. and Lane, R .P. (1999). Detection of Leishmania Lipophosphoglycan binding protein in the sand fly. Parasitology, 118: 27 -32.
- Dinse, N. ; Schonia ,G. ; Schweynoch ,C. and Presber ,W. (2001) : Evaluation of different PCR assays for direct detection of Leishmania parasites. Poster . In World leish –II .crete .
- Dondji , B. ; D. Duhlinski ; A. Same ; and I . Yimagau.(1998). Clinical and Parasitological prevalence of Cutaneous Leishmaniasis in Mokolo Focus , far province of Cameroon . Bull. Liais . *doc* .*Oceac* ., 31(1) : 40 – 45.
- Doyle, P.S. and Dwyer, D. M. (2005). Leishmania : Immunochemical comparison of the secretory (extracellular) acid phosphatases from various species. *Exp. Parato*., (77): 435-44
- Elahe ,B. ; Mohsen, K. ; Hasan, A and Kamyar , A. (2013). Molecular Identification of Leishmania Species Isolated From Human Cutaneous Leishmaniasis in Poledokhtar District, Lorestan Province, Iran . Jundishapur Journal of Microbiology , 6(6): 8103.
- El-Gorban , H. A. (1996) . Comparison of the effects of the intra lesional therapy of Cutaneous Leishmaniasis .M. Sc. Thesis. College of Medicine. University of Tikrit .
- Erb , K. ; Blank, C. ; Ritter, U.; Bluethmann, H. and Moll, H. (1996). Leishmania major infection in major histocompatibility complex class II-deficient mice: CD8+ T cells do not mediate a protective immune response. 195: 243-260.
- Ershadi , M. and Javadian, E.(1996) . Epidemiological Study of reservoir hosts in an Endemic area of Zoonotic Cutaneous

Leishmaniasis in Iran . Bulletin of the World Health Organization, 74 (6) : 587 – 590 .

- Fakhar, M. ; Motazedian, M. H.; Asgari, Q. ; Kalantari, M.; Hatam, G.R.; Akbarpoor, M.A. and Gharachahi, M.A. (2010). The efficacy of PCR for early diagnosis and detection of asymptomatic cases of Visceral Leishmaniasis in human and dog. *J. Jahrom. Univ. Med. Sci* ., 8: 1–6.
- Fata, A. ; Khamesipour, A.; Mohajery, M. (2009). Whatman paper (FTA cards) for storing and transferring Leishmania DNA for PCR examination. *Iran .J .Parasitol* , 4(4): 37-42.
- Faulde, M. ; Schrader, J. ; Heyl, G. and Amirih, M. (2008). Differences in transmission seasons as an epidemiological tool for characterization of anthroponotic and zoonotic cutaneous Leishmaniasis in northern Afghanistan. *Acta. Tropica,* 10 (5): 131-138.
- Fazaeli, A.; Fouladi, B.; Hashemi-Shahri, S.M. and Shrifi, I.(2008). Clinical features of cutaneous leishmaniasis and direct PCR-based identification of parasite species in a new focus in southeast of Iran. Iran. *J .Pub .Health*., 37(3): 44-51.
- Ferreira, W.A. ; Mayrink, W. ; Dos Mares-Guia, M.L. and Tavares, C.A. (2009). Detection and characterization of Leishmania antigens from an American Cutaneous Leishmaniasis vaccine for diagnosis of visceral leishmaniasis. Diagn. *Microbiol. Infect. Dis* ., (45): 35-43.
- Finkelman , F. D. ; Holmes , J. and Katona , I. M. (1990) : Lymphokine control of vivo immunoglobulin isotypes selection. *Ann. Rev. Immunol* ., 8: 303-333.

- Fiorention, D. F. ; Zltink, A. ; Viera , P. (1991) . IL-10 act on the antigen presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cell . *J. Immunol* ., 146:3444-3451 .
- Fox, H.S.; Bond, B.L. and Parslow, T.G. (1996). Estrogen regulates the IFN- promoter. *J. Immunol*,14(6): 4362–7.
- Furth, R.V. Theda ; Eejilt , P.C. (1985) . *In vitro* determination of phagocytosis and intracellular killing by polymorphonuclear phagocytosis , 125 pp.
- Gangneux, J. P. ; Menotti, J. ; Lorenzo, C. (2003). Prospective value of PCR amplification and sequencing for diagnosis and typing of old world Leishmania infections an area of nonendemicity. *J Clin Microbiol* ., 41(4): 1419-22.
- Garcia, A. ; Kindt, A. ; Quispe - Tintaya, K. ;Bermudez, H. ; Llanos, A. ; Arevalo, J. ; Bañuls,A ; De Doncker, S. ; Le Ray, D. and Dujardin , J. (2005) . American t egumentary leishmaniasis:antigen - gene polymorphism , taxonomy and clinical pleomorphism . *Infect. Genet. Evol* ., 5(2):109-16.
- Gerald, F. ; Spath, S. ; Linda ,E. ; Ben, L. ; Steven, M. ; Herbert, A. ; Avila, J. and Stephen, M. (2000). Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite Leishmania major. Department of Molecular Microbiology , Washington University School of Medicine. *Proc. Natl. Acad. Sci. St. Louis, USA* ., 97(16): 9258–9263.
- Ghalib , H. W. ; Piuvezam , M. R. and Skeiky , Y. A. W. (1993) . Interleukin - 10 production correlates with pathology in human Leishmania donovani infections . *J. Clin. Invest* ., 92 : 329 - 342 .
- Ghasemian, M.; Maraghi, S.; Samarbafzadeh, A.R.; Jelowdar, A. and Kalantari, M. (2011). The PCR-based detection and identification of

the parasites causing human cuta- neous Leishmaniasis in the Iranian city of Ahvaz. *An. Trop. Med. Parasitol* , 105: 209–215.

- Giannini, M.S. H. (1996). Sex-influenced response in the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis in mice. *Parasite Immunol*, (8): 31–7.
- Gicheru, M.M. ; Olobo, J.O. ; Anjili, C.O. ; Orago, A.S. ; Modabber, F. and Scott, P. (2001). Vervet monkeys vaccinated with killed Leishmania major parasites and interleukin-12 develop a type 1 immune response but are not protected against challenge infection. *Infect. Immun*, (69): 245-251.
- Gomes , N. A. and Dos , R. (1998) : Unresponsive CD4 T - lymphocyte from Leishmania chagasi infected mice increase cytokine production and mediate parasite killing after blockade of B7 - 1/CTL - A molecular pathway . *J. Infect Dis* ., 178 - 184 .
- Guirges, S.Y. (1971). Natural and Experimental re-infection on man with oriental sore . Ann .Trop. Med. parasitol ., 65 (2):197-205.
- Handman, E. (2001). Leishmaniasis Current status of vaccine development . *Clin. Microbiol*, Rev. 229-243.
- Handman, E. ; Symons, F. M. ; Baldwin,T. M. ; Curtis, J. M. and Scheerlinck, J. P.(2005). Protective vaccination with promastigote surface antigen 2 from Leishmania major is mediated by a TH1 type of immune response. *Infect. Immun* , (63): 4261–4267.
- Hashemi, S. ; Mohebali, M. ; Mansouri, P. ; Bairami, A. ; ajjaran, H. ; Akhoundi, A. and Charehdar, S. (2010). comparison of Leishmanin Skin Test and Direct Smear for the Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. index. *J .Cutan. Pathol .,* 39 (3): 347-355.
- Hatam , G. R. ; S. M. Hussayni , and S. Ardehali .(1997) . Dermatropic isolated of Leishmania infantum in Iran. Trans. Roy. *Soc. Trop . Med . Hyg .,* 90 (4): 337 – 448.

- Hazra, B. ; Golenser, J. ; Nechemiya, O. ; Bhattacharyya, S. ; Azzam, T. ; Domb, T. and Frankenburg , S. (2002). Inhibitory activity of diospyrin derivatives against Leishmania major parasites *in vitro*. *Indian. J. Pharmacol* ., 34 : 422 – 427.
- Hsiao, CH. (2011).The effects of macrophage source on the mechanism of phagocytosis and intracellular survival of Leishmania. Microbes and *infection / Institut Pasteur*, 13:1033–1044.
- Huber, M. ; Timms, E. ; Mak, T. W. ; Rollinghoff, M. and Lohoff, M. (1998). Effective and long-lasting immunity against the parasite Leishmania major in CD8-deficient mice. *Infect Immun*, (66): 3968-3970.
- Ifeoma, O. and Jude, U. (2009). Vaccines and vaccination strategies against human cutaneous leishmaniasis. Department of Immunology. Faculty of Medicine, University of Manitoba. Winnipeg. Manitoba CA ., 5(5): 291-301.
- Ilg, T. (2000a). Lipophosphoglycan is not required for infection of macrophages or mice by Leishmania mexicana. *EMBO*, J., 19: 1953-1962.
- Ilg,T. (2000b). Proteophosphoglycans of Leishmania. Parasitology Today, 16: 489-497.
- Ivens, A. (2005). The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* , 309 : 436-42 .
- Jarallah, H. (2009). Experimental study of the pattern infection with cutaneous leishmaniasis between males and females of mice. *Med. Hyg* ., 76(5): 896-901.
- Jardim, A. ; Tolson, D.L. ; Turco, S.J. ; Pearson, T.W. and Olafson, R.W.(1991). The Leishmania donovani lipophosphoglycan T

lymphocyte-reactive component is a tightly associated protein complex. *J. Immunol*,14(7): 3538–3544.

- Johnson , P. T. and M. Hertig . (1990). Behavior of Leishmania in Panamanian Phlebotomine sand flies fed on infected animals . *Ex. Parasitol* , 27: 281 – 300 .
- Jourquera, A. ; Ledezma, E. and Sousa, L. (1998). Epidemiologic characterization of American cutaneous leishmaniasis in an endemic region of Eastern Veezula . *Am J. Trop. Med Hyg* ., (58): 589-593.
- Kagan , I. G. and Norman, L. (1970) . Normal of Clinical Microbiology . *Am. Soc. Microbial. Washington* , 479 pp.
- Karadeniz , H. ; Erdem , A. and Caliskan , A. (2007). Electrochem-ical monitoring of DNA hybridization by multiwalled carbonnanotube based screen printed electrodes. : 20 :1932–1938
- Kemp , K. and Theander , T. G. (1999) . Leishmania specific T - cell expressing IFN - γ and IL - 10 upon activation are expanded in individual cured of VL . *Clinical .Exp. Immun.* , 116 : 500 - 504 .
- Kerr, S.F. ; McHugh, C.P. and Dronen, N.J. (2008). Leishmaniasis in Tex-as: prevalence and seasonal transmission of Leishmania mexicana in Neotoma micropus. *Am. J. Trop. Med. Hyg* ., 53(1):73-7.
- Khalaf, C. (2010). Epidemiological and experimental study of Visceral Leishmaniasis in Wassit governorate. M.S.c .Collage of Veterinary Medicine, University of Al-Qadisiya . Qadisiya, Iraq.
- Killick - Kendrick , R. (1990) . The life cycle of Leishmania in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host . *Ann. Parasitol. Hum. Comp* ., 65 (suppl.) : 37 - 42 .
- Klein, S. L. (2004). Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. Department of Molecular Microbiology and Immunology, The Johns Hopkins

Bloomberg School of Public Health, *Baltimore*. *MD*. USA ., (26): 247–264.

- Lainson , R. and, Shaw, J. J. (1987). Evaluation , Classification and Geographic distribution in Peters , W. Killick –Kendrick R. eds. The Leishmaniasis in Biology and Medicine . London. Academic Press , 1 – 120 .
- Lambson, B.; Smyth, A. and Barker, D. (2000). Leishmania donovani: Development and characterization of akinetoplast DNA probe and its use in the detection of parasites. *Exp. Parasitol* , 94 :15-22.
- Laskay, T. ; Miko, T. L . ; Negesse , Y. ; Solbach , W. ; Rollinghoff , M. ; Frommel , D. (1995). Detection of cutaneous Leishmania infection in paraffin-embedded skin biopsies using the polymerase chain reaction. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg* ., 89: 273–275.
- Launois, P. ; Tacchini-Cottier, F. ; Parra - Lopez, C. and Louis, J.A. (1998). Cytokines in parasitic diseases: the example of cutaneous Leishmaniasis. International Reviews of Immunology, 17: 157-180.
- Mahdy, M. A. K. (2010). Molecular Characterization of Leishmania Species Isolated from Cutaneous Leishmaniasis in Yemen Plosone , Journal. Pone . 5(9): e12879.
- Mahmoodi, M. ; Mohajery,M.; Tavakkol, A.; Shakeri, M. ; Yazdan, p. and Berenji , F. (2010) . Molecular identification of Leishmania species causing cutaneous leishmaniasis in Mashhad, *Iran. Jundishapur. J. Microbiol*, 3(4): 195-200.
- Mahmoodi, M.R, Mohajery, M.; Tavakkol Afshari, J.; Shakeri, M.T.; Yazdan panah, M.J.; Berenji, F.; Fata, A. (2010). Molecular identification of Leishmania species causing cutaneous leishmaniasis in Mashhad, *Iran. Jundishapur .J .Microbiol*. 3(4): 195-200.

- Mandell , G. L. ; Bennett, J. E. and Dolin, R. . (1995). Principles and Practice of infection disease.. 4th Edition . Churckill Livingstone. USA ., (2) : 205 pp.
- Manson-Bahar, P. and Bell, O. R. (1987). Manson's Tropical Diseases . 9th ed. Baillier Tindall. London. Philadelphia. Toranto. Sydney. Tokyo. 24-28 Oval road London NW17DX, England.
- Maraghi, S. ; Zadeh, A. ; Sarlak , A. ; Ghasemian,M. and Vazirianzadeh, B. (2007). Identification of Cutaneous Leishmaniasis Agents by Nested Polymerase Chain Reaction (Nested-PCR) in Shush City, Khuzestan Province, Iran. Iranian .*J . Parasitol* ., (2)3: 13-15.
- Marfurt, J. ; Niederwieser, I. ; Makia, N. ; Beck,H. and Felger, I. (2003). Diagnostic genotyping of Old and New World Leishmania species by PCR-RFLP. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis* ., 46:115-124.
- Margaret , M. and David , M. (2001) : The role of IL - 10 in promoting disease progression in Leishmaniasis . *J. Immunol* ., 166 : 1141 – 1147 .
- Marquardt, W. C. ; Demaree, R. S. and Grieve, R. B. (2000) . Leishmania and Leishmaniasis . In Parasitology and Vector Biology . Academic Press, London : 50-70.
- Mock, B.A. and Nacy , C. A. (1988). Hormonal modulation of sex differences in resistance to Leishmania major systemic infections. *Infect. Immun* ., (56) : 3316 –19.
- Modabber , F. (2000) . First generation Leishmaniasis vaccine in clinical development : Moving but what next ?. Current Opinion in Anti-infective Drugs ., 21(1): 35-39.
- Modabber, F. (1990).Vaccines against Leishmaniasis . *Scand. J. Infect. Dis* ., (suppl.76):72-78.

- Moemenbelah-Fard, M. D. ; Kalantari, M.Y ; Javadian , E. (2003). The PCR-based detection of Leishmania major infections in Meriones libycus (Rodentia: Muridae) from southern Iran. *Ann. Trop. Med. Parsitol* ., 97: 81–816.
- Mohammad, H.D. ; Mohammad, H. M. and Mohsen, K. (2014) . Molecular Survey on Detection of Leishmania Infection in Rodent Reservoirs in Jahrom District, Southern Iran , *Ann. Trop. Med. Parsitol* 8(2): 139–14.
- Mohebali, M. ; Motazedian, M.H. ; Parsa, F. ; Hajjaran, H. (2002). Identification of Leishmania species from different parts of Iran using a random amplified polymorphic DNA in human, animal reservoirs and vectors. *Med. J. Islamic. R .Iran* ., 15(4):243-46.
- Motazedian, H. ; Karamian, M. ; Noyes, H.A. ; Ardehali , S. (2002). DNA extraction and amplification of Leishmania from archived , Giemsa-stained slides, for the diagosis of cutaneous Leishmaniasis by PCR. *Ann. Trop. Med . Parasitol* , 96(1): 31-4.
- Motazedian, M.H. ; Mehrabani, D. ; Oryan, A. ; Asgari, Q. ; Karamian, M. and Kalantari, M. (2006) . Life cycle of cutaneous leishmaniasis in Larestan , southern Iran. Iran. *J. Clin .Infect .Dis* ., 1: 137–143.
- Motazedian, M.H.; Parhizkari, M.; Mehrabani, D.; Hatam, G.R. and Asgari, Q. (2010). First Detection of Leishmania major in Rattus norvegicus from Fars Province, southern Iran. Vector Borne Zoonotic Dis ., 10: 969–975.
- Murray , H. W. ; Freemans, Lu , C. M. and Coffman , R. L. (2002) : Interleukin - 10 in experimental visceral leishmaniasis and interleukin - 10 receptors blockade as immunotherapy . *Infect.Immun* ., 70 : 6284 - 6293 .

- Murray, H.W.(1981) .Susceptibility of Leishmania to oxygen intermediate and killing by normal macrophage in culture .*j. Exp*, med ., 150 : 938-949 .

- Myles, O. ; Wortmann , G.W. and Cummings, J.F. (2007).Visceral leishmaniasis: clinical observations in 4 US army soldiers deployed to Afghanistan or Iraq, 2004-2007. *Arch. Intern. Med* .,167(17):1899-901.

- Nadim, A. ; Azizi, F. (2000). Epidemiology and control of prevalent diseases in Iran. Iran, 2nd ed., Iran, Publications of Payam Noor University , 524-32.
- Najim , R. A. (1996) .Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Zinc Sulfate . Ph. D. Thesis. College of Medicine. University of Baghdad.
- Nascimento, E.W. ; Mayrink, C.A. ; Costa, M.S. ; Michalick, M.N. ; Melo, G.C. ; Barros, M. ; Dias, C.M. ; Antunes, M.S. and Lima, D.C.(2004). Vaccination of humans against cutaneous leishmaniasis: cellular and humoral immune responses. *Infect Immun* ., (58): 2198-2203.
- Navin, T.R. ; Arana, B.A. ; Arana, F.E. ; Berman, J.D. and Chajon, J.F. (1992). Placebo-controlled clinical trial of sodium stibogluconate (Pentostam) versus ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *J. Infect. Dis* ., 165: 528-534.
- Noyes , H.; Reyburn ,H .; Bailey ,W. and Smith ,D.(1998): A nested – PCR based schizodem method for identifying *leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. *J. Clin .Microbiol*, (10)36: 2877-2881.

- Ojha, R. ; Cervantes, D. ; Fischbach, L. (2007). Oral pentoxifylline and pentavalent antimony for treatment of leishmaniasis: promising but inconclusive evidence of superiority, compared with antimony monotherapy. *Clin. Infect*. *Dis*., 45 (8): 1104.
- Ovendale, P.J. ; Martin, T.I. ; Webb, J.R. ; Campos-neto, A. ; Reed, S.G.; Badaro, R. and Stromberg, E.J .(1998). Human and murine immune responses to a novel Leishmania major recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. *Infect Immun* ., 66(7):3279-3289.
- Overath, P. and Harbecke, D. (1993). Course of leishmania infection in beta 2-microglobulin-deficient mice. Immunology Letters, 37: 13-17.
- Parvizi, P. and Ready, p. (2008). Nested PCRs and sequencing of nuclear ITS - rDNA 400 fragments detect three Leishmania species of gerbils in sandflies from Iranian foci of 401 zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Trop. Med. Int. Health* ., 13:1159-71.
- Parvizi, P.; Baghban, N.; Novin, E. and Absavaran, A.(2010). Detection,identification and molecular typing of Leishmania major inPhlebotomus papatasi from a focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis in central of Iran. *Exp Parasitol*. 124(2): 232-237.
- Pearson, R. D. ; A. Q. Sousa, and S. M. B. Jeronimo , (2000). Leishmania species: Visceral (kala – azar) , Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. In : Principles and Practical of infections disease . By : Mandell , G. L. 5th edition . Churchill Livingstone , *Philadelphia* , 2831 – 2834.
- Perez , V. L. ; Ledere , J. A. ; Lictitman , A. H. and Abbas , A. K. (1995) : Stability of Th 1 and Th 2 population . *Int. Immunol*. , 7 : 869 – 875 .

- Peters , W. and Killick - Kendrick, R. (1987) . The Leishmaniasis in Medicine, Academic Press : London.
- Pourmohammadi, B. ; Motazedian, M. H. ; Hatam, G. R. ; Kalantari, M.; Habibi, P. and Sarkari, B (2010) . Comparison of Three Methods for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. *Iran. J. Parasitol*., 5: 1–8.
- Powire , F. and Coffman , R. L. (1993) : Cytokine regulation of T-cell function: potential for therapeutic intervention .Immunol. Today , 14 : 270 - 274.
- Qader, A. ; Abood, M. and Bakir, T. (2012). Identification of leishmania parasites in clinical samples obtained from cutaneous leishmaniasis patients using PCR technique in Iraq.*Iraqi J.Sci*., 53:457-463.
- Rafati, S. ; Zahedifard, F. ; Nazgouee, F.(2006) . Prime–boost vaccination using cysteine proteinases type I and II of Leishmania infantum confers protective immunity in murine visceral leishmaniasis. Vaccine, 24 (12): 2169-2175.
- Rahim, G. and Tatar, I. (1966): Oriental sore in Iraq . IBID., 8-29.
- Rasheed, Z.N. (2004). Leishmaniasis in Iraq. Leishmania and zoonotic disease section. Communicable Disease Control Center CDC/Baghdad/Iraq.
- Rassam , M. B. and Al- Mudhaffar , S. A. (1997). The Primary Isolation of Leishmania donovani from Iraq on different culture media . *Ann. Trop. Med. Parasitol*., B (4) : 345 – 347 .
- Rassi, Y.; Jalali, M.; Javadian, E. and Motazedian, M.H (2001) . Confirmation of Meriones libycus (Rodentia: Gerbillidae) as the main reservoir host of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Arsanjun, Fars Province, south of Iran. *Iranian. J .Public. Health* ., 30: 143–144.

- Razmjou, S.; Hejazy, H. ; Motazedian, M.H .; Baghaei, M. Emamy, M. and Kalantary, M. (2009) . A new focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Shiraz, Iran. *Trans. R. Soc .Trop.Med. Hyg* ., 103: 727–730.
- Rebollar-Tellez, E.A. ; Tun-Ku , E. ; Manrique-Saide, P.C. ; Ndrade-Narvaez, F.J .(2005). Relative abundances of sandfly species (Diptera: Phlebotominae) in two villages in the same area of Campeche, in southern Mexico. *Ann. Trop. Med. Parasitol* ., 99(2):193-201.
- Reed, S.G.; Coler, R.N. and Campos-Neto, A. (2003). Development of leishmaniasis vaccine: the importance of Mpl. *Expert Review of Vaccines*, 2: 239-252.
- Reguera , R.M. ; J. C. Cubria, and Ordozen, D. (1998) . Review the Pharmacology of Leishmaniasis. *J. Pharmacy* ., 30 (4): 435 – 443.
- Remer, K.A. ; Apetrei , C. ; Schwarz, T. ; Linden, C. and Moll, H. (2007). Vaccination with plasmacytoid dendritic cells induces protection against infection with Leishmania major in mice. *Eur .J. Immuno* ., (37): 2463-73.
- Rhee, E.G. ; Mendez, S. ; Shah, J.A. (2002). Vaccination with heatkilled leishmania antigen or recombinant leishmanial protein and Cpg oligodeoxynucleotides induces long-term memory CD4+ and CD8+ T cell responses and protection against Leishmania major infection. *Journal . Exp. Med*., 195: 1565-1573.
- Ridley, D.S. (2004). The pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg* ., (73): 150-160.
- Ritting, M. and Bogdan , C. (2000). Leishmania-host-cell-interaction complexities and alternative view. parasitology today, 16 (7):292-297.

- Rivier, D. ; Balay, P. ; Shah, R.(1999).Vaccination against leishmania major in CBA mouse model of infection role of adjuvants and mechanism of protection .*parasite Immunol* , 21:461-473 .
- Robert, K. ; Johnstone, I. ; Milkah, M. ; Dennis, M. ; Reuben, L. ; Japhet, M. and Willy, T.(2011). Immunization with a combination of Leishmania major lipophospho¬glycan (LPG) and Phlebotomus duboscqi salivary gland lysates (SGLs) abrogates protective effect of LPG against L. major in BALB/c mice. *African, J. H. Sci*. , (18): 1-2.
- Rohousova, I. ; Ozensoy, S. ; Ozbel, Y. and Volf, P. (2005). Detection of species-specific antibody response of humans and mice bitten by sand flies. *Parasitol*, 130: 493-499.
- Rosenthal, E. ; Marty, P. ; del Guidice, P. ; Pradier, C. ; Ceppi, C. ; Gastaut , J. ; Le Fichoux, Y. and Cassuto, J. (2003). HIV and Leishmania coinfection: a review of 91 cases with focus on atypical locations of Leishmania. *Clin. Infect. Dis* ., 31(4) : 1093-1095.
- Russo, D.M. ; Turco, S.J. ; Burns, J.M. and Reed, S.G.(2002). Stimulation of human T lymphocytes by Leishmania lipophosphoglycan - associated proteins. *J. Immunol* ., 14(8):202–207.
- Ryan, J. R. ; Smithyman, A. M. ; Rajasekarial, G.H. ; Hochberg, L. ; Stiteler, J. M and Martin, S. K. (2002) . Enzyme – linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol* ., (3) 40:43- 48 .
- Sacks, D. and Noben - Trauth, N. (2002). The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice. Nature Reviews. *Immunol*, 2: 845-858.

- Sacks, D. L. (1989). Metacyclogensis in leishmania promastigote .*Exp .parasitol* , 69:100-103 .
- Sadick, M. D. ; Locksley, R. M. and Raff, H.V. (1986). Murine Cutaneous Leishmaniasis resistance correlates with capacity to generate interferon- γ in response to Leishmania antigen *in vitro J.Immunal* ., 36 : 655-660.
- Safaei, A. ; Motazedian, M. H. ; Vasei, M. (2002). Polymerase chain reaction for diagnosis of cutaneous leishmaniasis in histologically positive, suspicious and negative skin biopsies. *Dermatol*., 205(1): 18-24.
- Salomon, O. D. ; Wilson, M. L. ; Munstermann, L. E. and Travi , B.L.(2007). Temporal patterns of Phlebotominae sand flies (Diptera: Psychodidae) in a Cutaneous Leishmaniaisis focus in Northern Argentina. *J. Med. Entomol* .,(41): 33-39.
- Sambrook, J. ; Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1990). Molecular cloning: A laboratory manual . 2nd edition, Cold spring harbor laboratory press, cold spring Harbor, New York.
- SAS , Institute (2001) : User's Guide , Satistic Version , SAS Institute Inc. , Cary , NC. , USA.
- Satoskar, A. and Alexander, J. (1995). Sex mediated susceptibility and differential IFN-γ and TNF-α mRNA expression in DBA/2 mice infected with Leishmania Mexicana . *Immunol* , (84): 1–4.
- Schönian, G. ; Akuffo, H. ; Lewin, S. ; Maasho, K. ; Nylén, S. ; Pratlong, F. ; Eisenberger , C. ; Schnur, L. and Presber, W. (2009). Genetic variability within the species Leishmania aethiopica does not correlate with clinical variations of cutaneous leishmaniasis. *Mol. Biochem. Parasitol* ,106 : 239-248**.**
- Schuster, F. L. and Sullivan, J. J. (2002). Cultivation of clinically significant hemoflagellates. *Clin. Microbiol . Rev* ., 15 (3): 374-389.

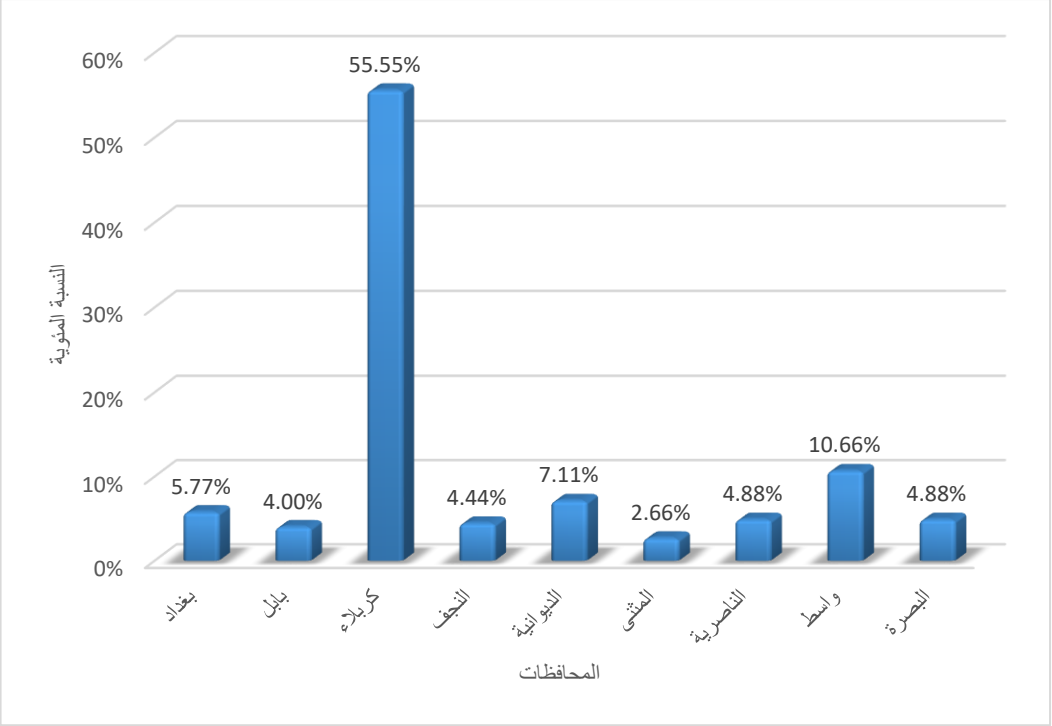
- Shakarian, A. M. and Dwyer, D. M. (2008). Structurally conserved soluble acid phosphatases are synthesized and released by Leishmania major promastigotes. *Exp. Parasitol*, (95): 79-84.
- Sharifi , I. ; Fekri , R. ; Aflatonian, M. ; . Nadim , A ; Nikian, Y. and Kamesipour, A. (1998) . Cutaneous Leishmaniasis in primary School Children in South- Eastern Iranian city of Bam, 1994 – 1995. Bulletin of the World Health Organization , 76 (3): 219 – 318.
- Shiraz, J. and Syed, M. (2007). Cutaneous leishmaniasis in Pakistan. Gomal Medical College. Dermatology Online Journal , 11(1): 4 -9
- Shoaib, S. h. ; Tauheed, S. h. and Hafeez, H. (2007). cutaneous leishmaniasis: an emerging childhood infection. *J. Ayub. Med. Coll. Abbottabad* , 19 (4) : 40 -45.
- Shubber , E. K. and Al-Allak, B.M.A. (1986). Spontaneous chromosomal Abreation and SCE in Human Lympocyte , effect of culture condition . *The nucleus* , 29 (3) : 92-98.
- Skeiky, Y.A. ; Ovendale, P.J. ; Jen, S. ; Alderson, M. R. ; Dillon, D. C. ; Smith, S. ; Wilson, C.B. ; Orme, I.M. ; Reed, S.G. and Campos-Neto , A. (2000). T cell expression cloning of a Mycobacterium tuberculosis gene encoding a protective antigen associated with the early control of infection. *J . Immunol*., 165: 7140-7149.
- Snapper , C.M. and Paul , W. E. (1987) : Interferon gamma and B - cells stimulatory factor - 1 reciprocally regulate Ig. Isotype production , *Science* , 236 : 944 - 947 .
- Soares, R. P. ; Macedo, M. E. ; Ropert, C. ; Gontijo, N. F. ; Almeida, I. C. ; Gazzinelli, R. T. ; Pimenta, P. F. and Turco, S.J. (2008). Leishmania chagasi: lipophosphoglycan characterization and bindingto the midgut of the sand fly vector Lutzmyialongipalpis. Mol. Biochem. *Parasitol* , 12(1): 213-24.

- Sorachi, K.L. ; Kumagai, S. ; Sugita, M. ; Yodoi, J. and Imura, H. (1993) . Enhancing effect of 17 beta-estradiol on human NK cell activity. *Immunol. Lett* ., (1): 31–6.
- Sreenivas, G. ; Ansari, N.A. ; Singh, R. ; Subba Raju, B. V. ; Bhateja , R. ; Negi, N. S. and Salotra, P. (2002). Diagnosis of visceral leishmaniasis: Comparative potential of amastigote antigen, recombinant antigen and PCR. *Br .J. Biomed .Sci* ., 59: 218–222.
- Stauber, L. A. (1953). Some effect of host environmental on the course of Leishmania in hamster. Ann. N. Y. *Acad. Sci* ., 56 (arts) : 1064-1069 .
- Stauber, L. A. ; Jackson ,G. J; Herman, R. and Singer I. (1970). Leishmanias In : Immunity in mammalian hosts . Appleton- center Crofts. New York , : 214 . pp .
- Stobie, L. ; Gurunathan, S. ; Prussin, C. ; Sacks, D. L. ; Glaichenhaus , N. Wu CY and Seder, R. A. (2000) . The role of antigen and IL-12 in sustaining Th1 memory cells *in vivo*: IL-12 is required to maintain memory/effector Th1 cells sufficient to mediate protection to an infectious parasite challenge. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA, 97: 8427-8432.
- Sundar, S. ; Chakravarty , J. and Agarwal, D. (2010). Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in India. *N. Engl. J. Med* ., 362 (6) : 504-12.
- Taher, J. H. (2006) . Some biochemical and Immunological aspects of patients infected with visceral Leishmaniasis . thesis , College of Science , University of Babylon .
- Talari, S. ; Shajari, G. and Talaei, R. (2009). Clinical finding of cutaneous leishmaniasis as a new focus of Iran. Internet .*J. Inf. Dis* ., 5:1-5.

- Tashakori, M. ; Kuhls, K. ; Al-Jawabreh, A. ; Mauricio, I. ; Schonian , G. and Farajnia, S. (2006). Leishmania major : genetic heterogeneity of Iranian isolates by single-strand conformation polymorphism and sequence analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer. Acta Tropica , 98(1): 52-58.
- Tayeh , A. ; Jalouk , L. and Cairncross , S. (1997) . Twenty years of Cutaneous Leishmaniasis in Aleppo. Syria. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg* ., 9 (6): 657 – 659.
- Tilg , H. (1992) . Interleukin -8 serum concentrations after liver transplantation . Transplant , 53:800-803.
- Tonn, D . (2010) .Intracellular trafficking of Leishmania major peptidases. PhD thesis . university of Glasgow .
- Ueno, N. (2009). Differences in human macrophage receptor usage, lysosomal fusion kinetics and survival between logarithmic and metacyclic Leishmania infantum chagasi promastigotes. Cellular microbiology , 11:1827–1841.
- UL- Bari , A. ; Azam, SH. ; Ejaz, A. and Mahmood, T. (2010). Comparion of various cytodiagnostic tests in the rapid diagnosis of cutaneous leishmaniasis. Pakistan Journal of Pakistan Association of Dermatologists , 20: 63-69.
- Van Thiel, P. (2010). Miltefosine treatment of Leishmania major infection: an observational study involving Dutch military personnel returning from northern Afghanistan. Clinical Infectious Diseases , 50 (1): 80–3.
- Wang, Y. ; Campbell, H. D. and Young, I. G.(2003). Sex hormones and dexamethasone modulate interleukin -5 gene expression in T lymphocytes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol* ., (44): 203–10.

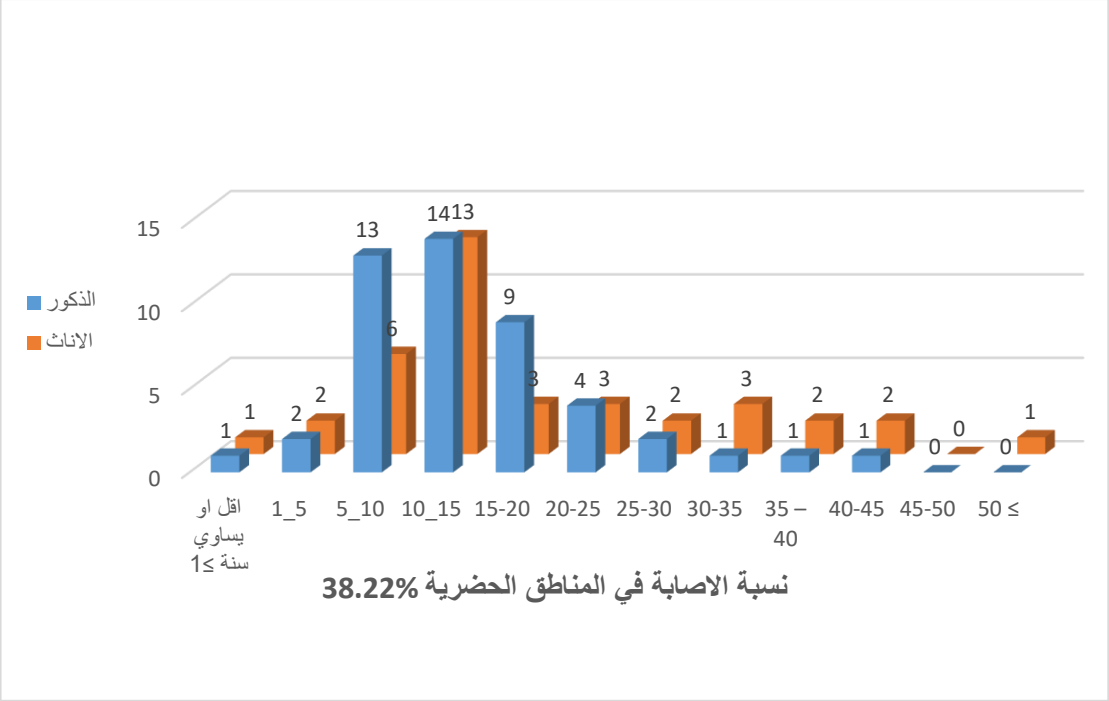
- Wolday, D. ; Akuffo , H. ; Demissie , A. and Britton, S. (2004). Role of Leishmania donovani and its lipophosphoglycan in CD4+ T-cell activation-induced human immunodeficiency virus replication. *Infect. Immun* ., (67): 5258-5264.
- World Health Organization WHO (2000). The leishmaniasis and Leishmania / HIV co-infection. Fact sheet No. 116. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- World Health Organization WHO .(2011c). World Health Organization , Technical Report Series, 701 :2-4. Expert committee (1984) epidemiological aspects.
- World Health Organization WHO. (1998). Leishmaniasis. Division of Control of Tropical Diseases . Geneva , 73 – 84.
- World Health Organization WHO. (2002). Cutaneous leishmaniasis Afghanistan". Weekly Epidemiological Record 77 (29): 246
- World Health Organization WHO. (2007). Cutaneous Leishmaniasis: Why are you neglecting me?, Geneva, Switzerland.
- World Health Organization WHO. (2008). Leishmaniasis: cutaenous leishmaniasis reports . consultative meeting on cutaneous Leshmaniasis . WHO Headquarters, from 30 April to 2 May2007 WHO/HTM/NTD/IDM. Leishmaniasis Control Programme, Geneva. www.WHO.org.
- World Health Organization WHO. (2010) . Communicable Disease Working Group on Emergencies, HQ Division of Communicable Disease Control, EMRO, WHO office, Baghdad. WHO Office.
- World Health Organization WHO. (2011a) . The world health report. Changing history. Geneva: WHO, 2007. www.who.int / whr / 2004 / en / index . html . (accessed June 12, 2011).

- World Health Organization WHO.(1984). The Leishmaniasis Report of a WHO Expert Commited Tech. Rep. Ser. No.701.Geneva , Switzer land , 179 pp .
- World Health Organization WHO.(2009a). Leishmaniasis. Magnitude of the problem .
- World Health Organization. (1990): Control of the Leishmaniasis. Technical series no.793 ,WHO Geneva ,Switzerland , 158. pp.
- World Health Organization/TDR. (2004). Leishmaniasis - disease information .
- Yamakami, K. ; Oda, T. ; Watanabe, N. ; Matsuzawa, A .; Nariuchi, H. ; Tdakuma, T. and Yoshizawa, N. (2005). Immune response in resistant and susceptible strains of CD4 mutant mice infected with Leishmania major. *J. Heal. Scie*., 51(1) : 55-61.
- Yehia, L. ; Adib-Houreih, M.; Fawzi, W.; Kibbi, A.; Loya, A. and Wilson, S. (2012): DNA-based methods in the detection of Leishmania parasites: Field application and practicalities .*Ann. Trop. Med. Parasitol* , 4(5):127-138.

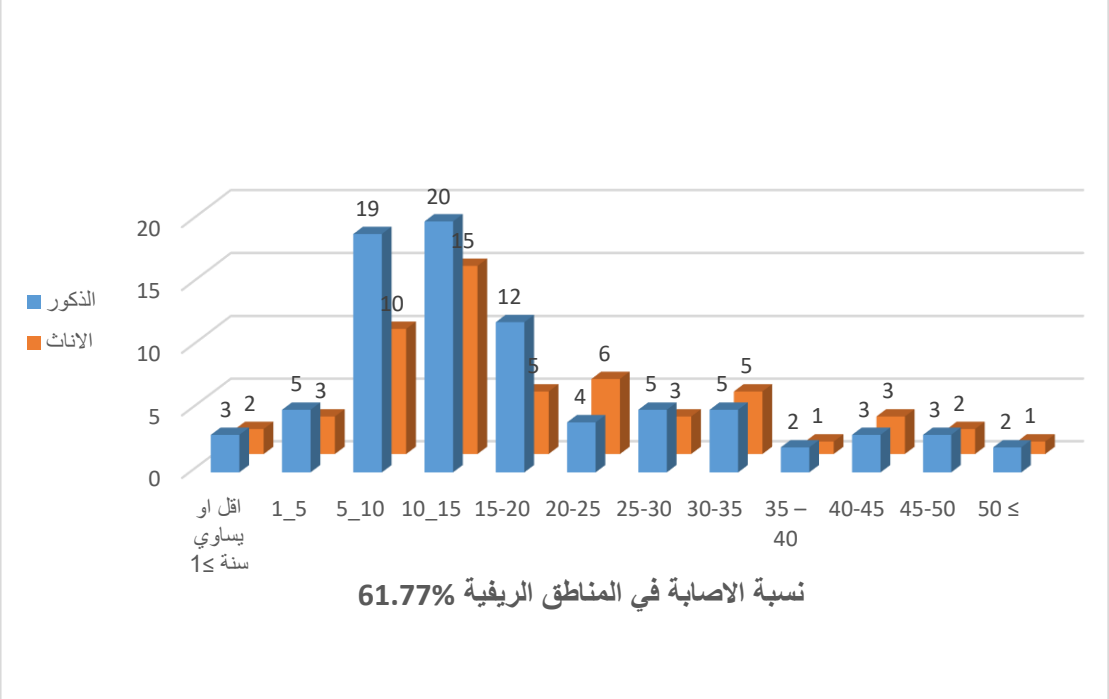


شكل (1) النسبة المئوية للاصابة بداء اللشمانيا الجلدية CL في بعض المحافظات العراقية

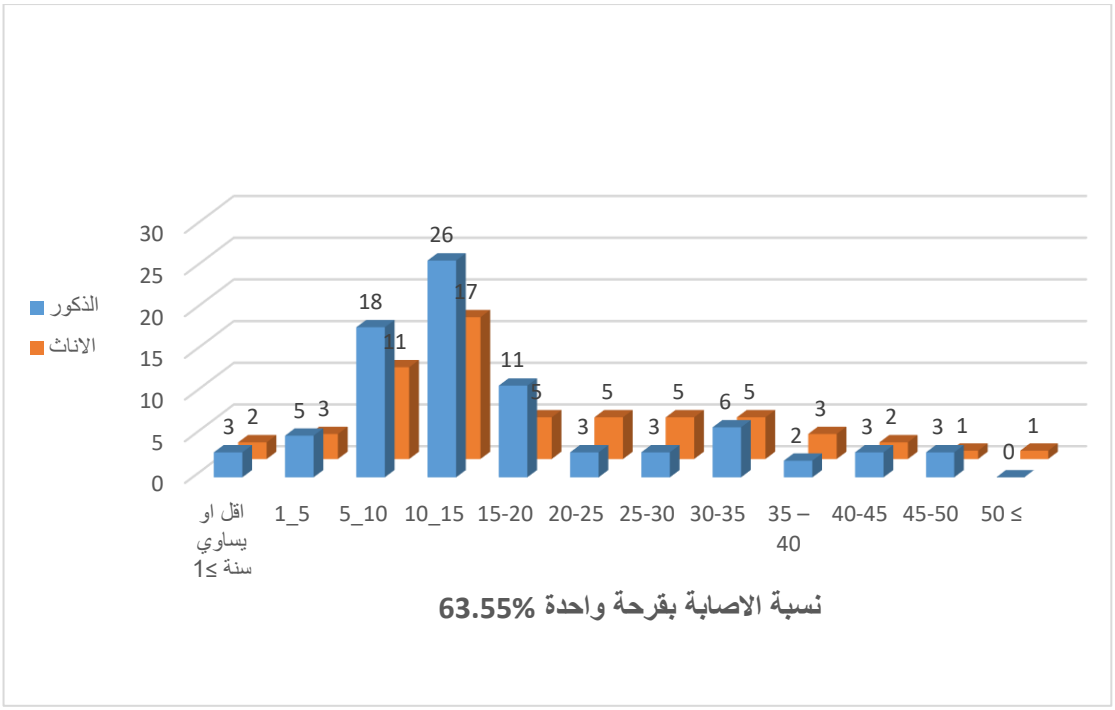
شكل (2) توزيع الاصابة بداء اللشمانيا الجلدية استنادا الى والجنس والفئة العمرية



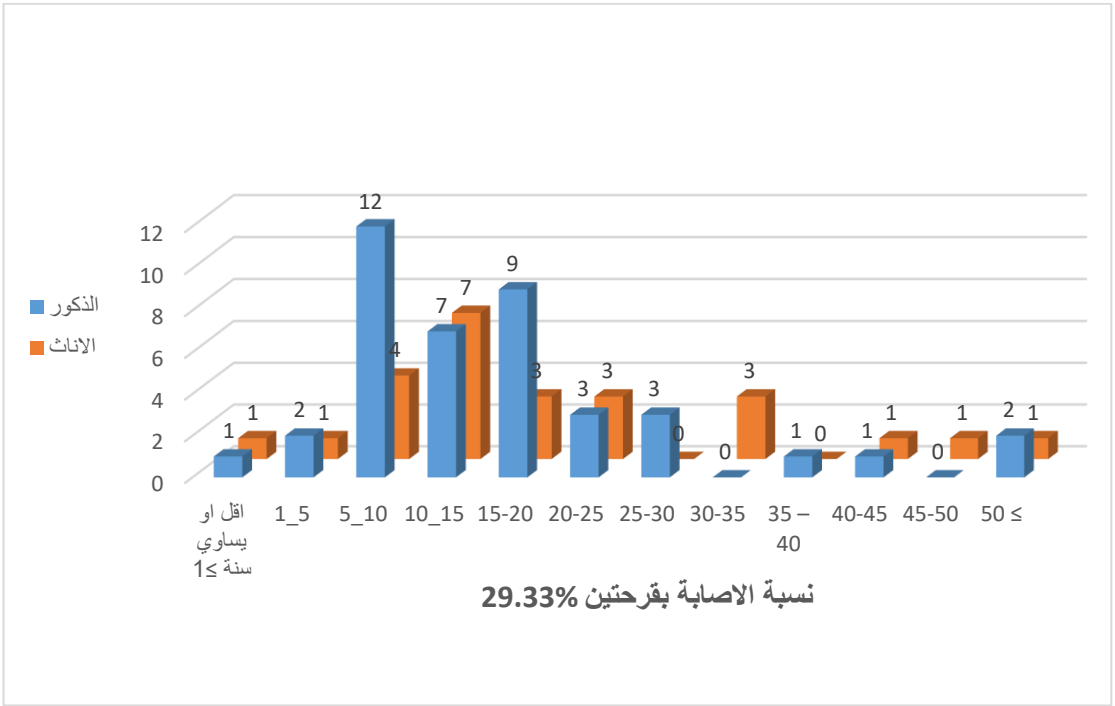
شكل (3) توزيع الاصابة بداء اللشمانيا الجلدية استنادا الى نوع السكن (المناطق الحضرية)



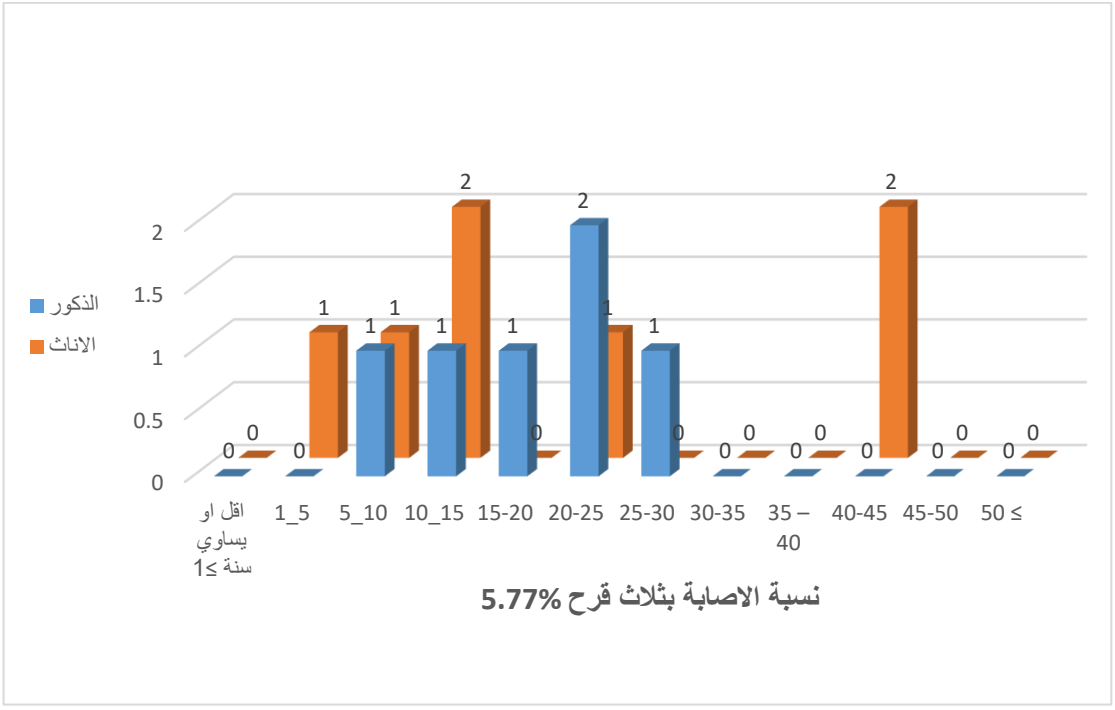
شكل (4) توزيع الاصابة بداء اللشمانيا الجلدية استنادا الى نوع السكن (المناطق الريفية)



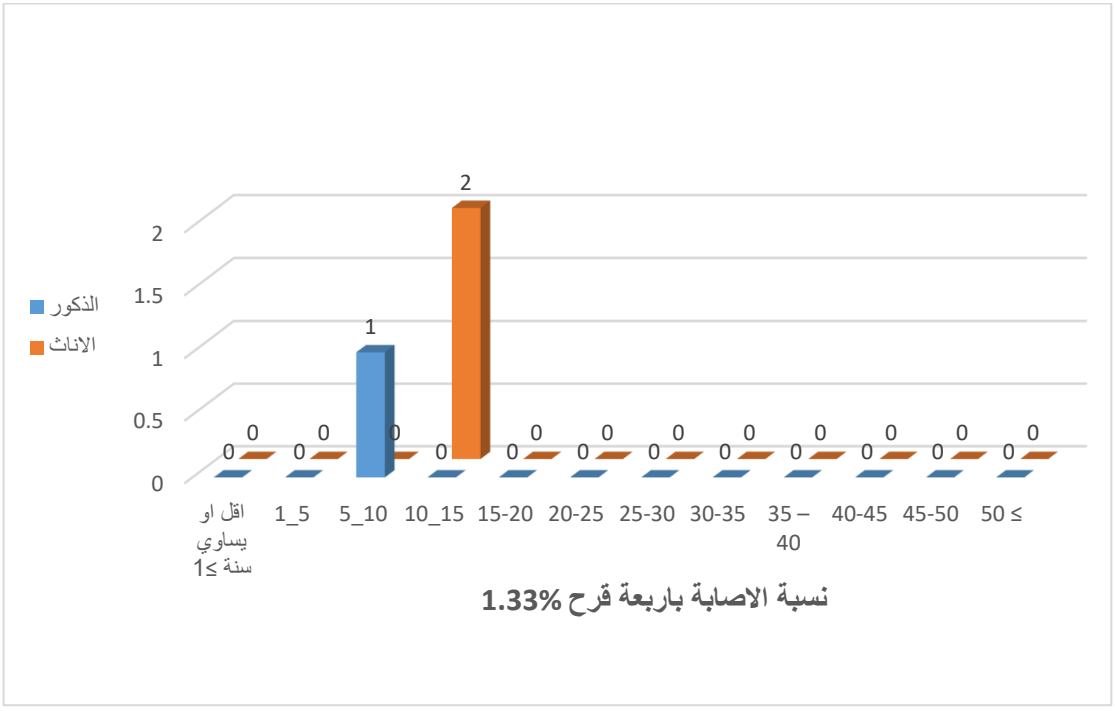
شكل (5) توزيع الاصابة باللشمانيا الجلدية نسبة الى عدد قرح الإصابة (بقرحة واحدة)



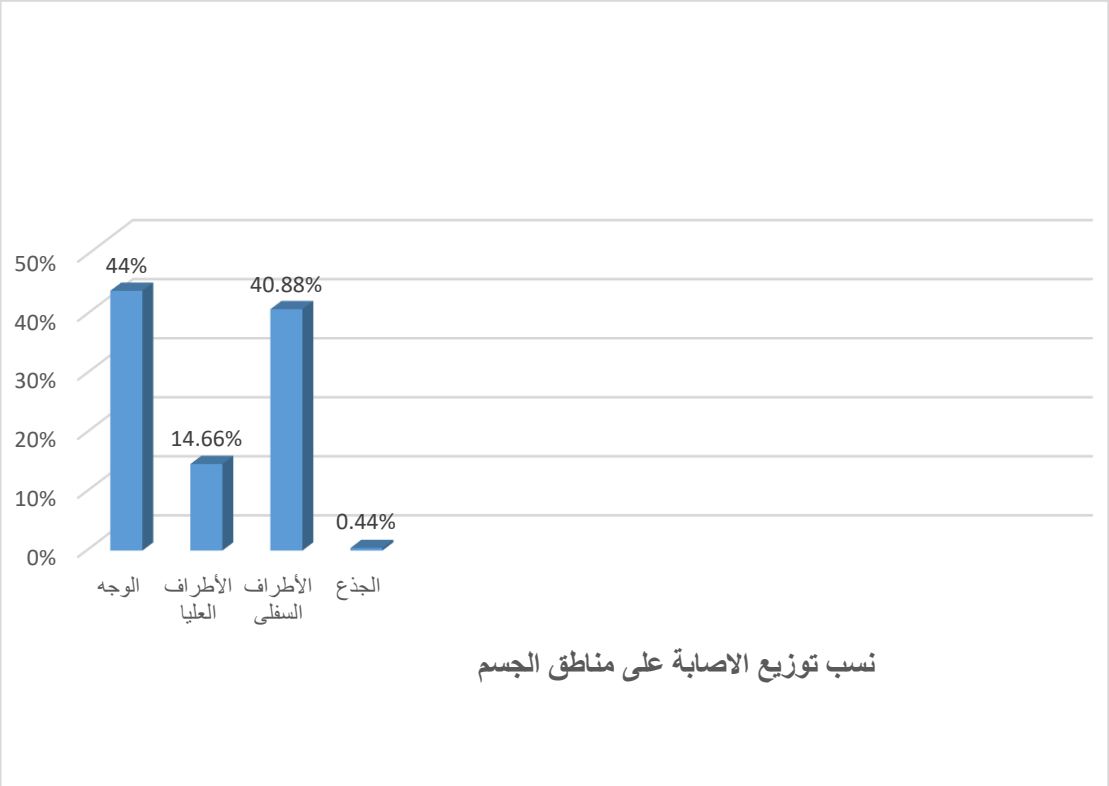
شكل (6) توزيع الاصابة باللشمانيا الجلدية نسبة الى عدد قرح الإصابة (بقرحتين)



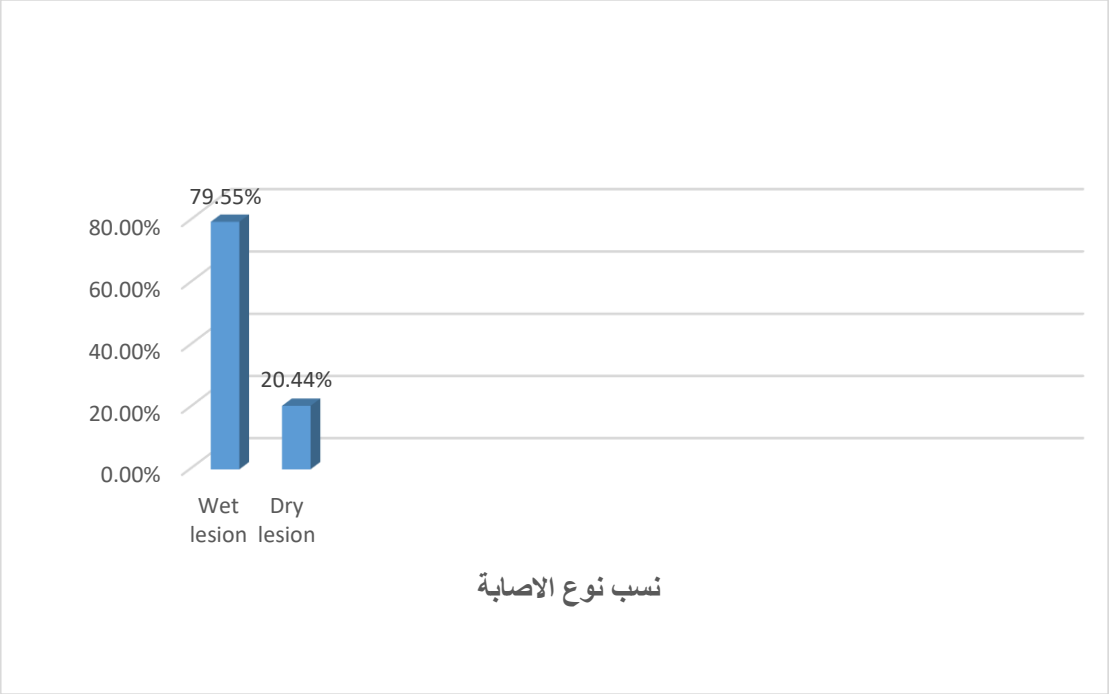
شكل (7) توزيع الاصابة باللشمانيا الجلدية نسبة الى عدد قرح الإصابة (بثلاثة قرح)



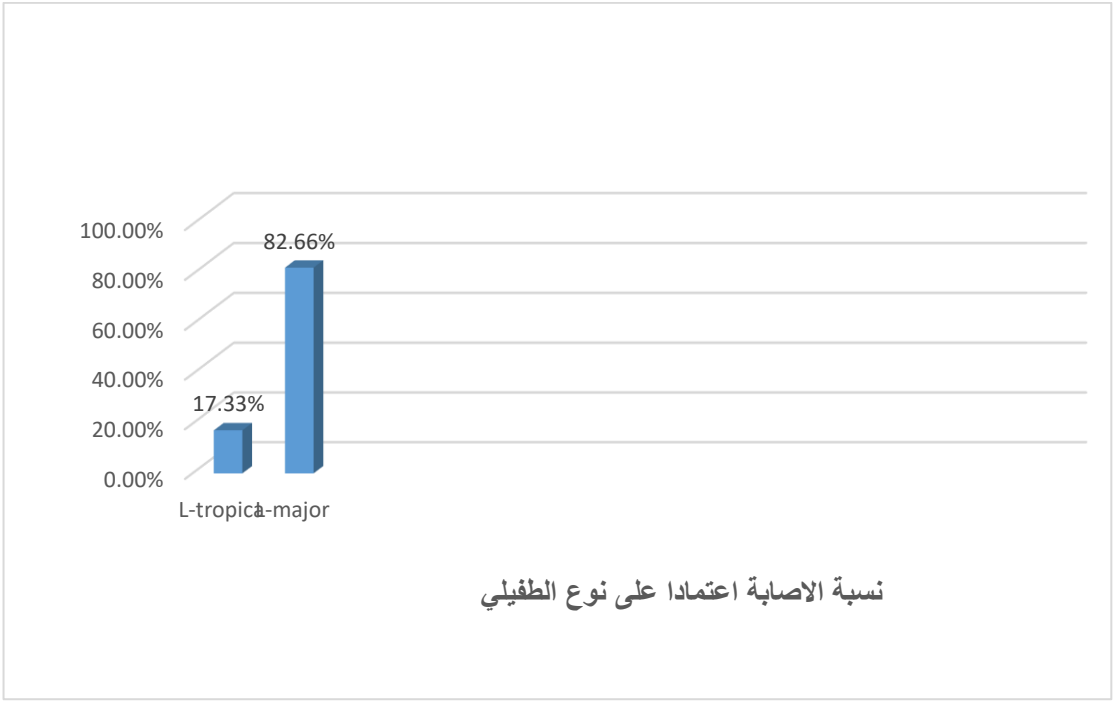
شكل (8) توزيع الاصابة باللشمانيا الجلدية نسبة الى عدد قرح الإصابة (بأربعة قرح)



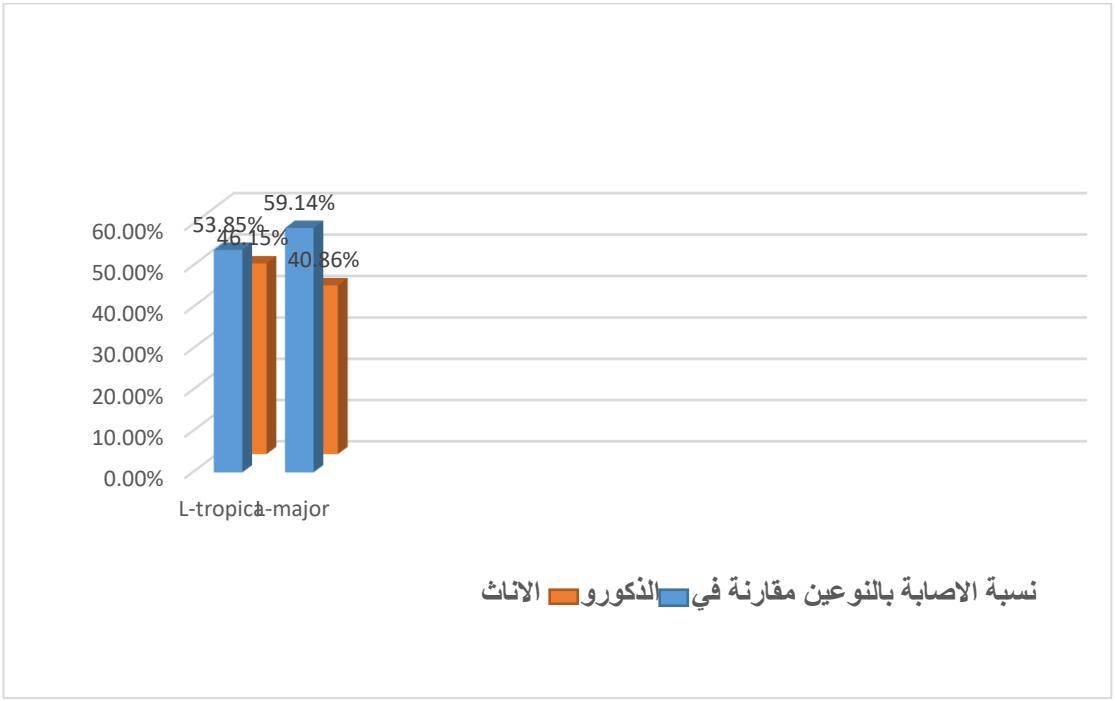
شكل (9) توزيع الاصابة بالنسبة لموقعها على مناطق الجسم



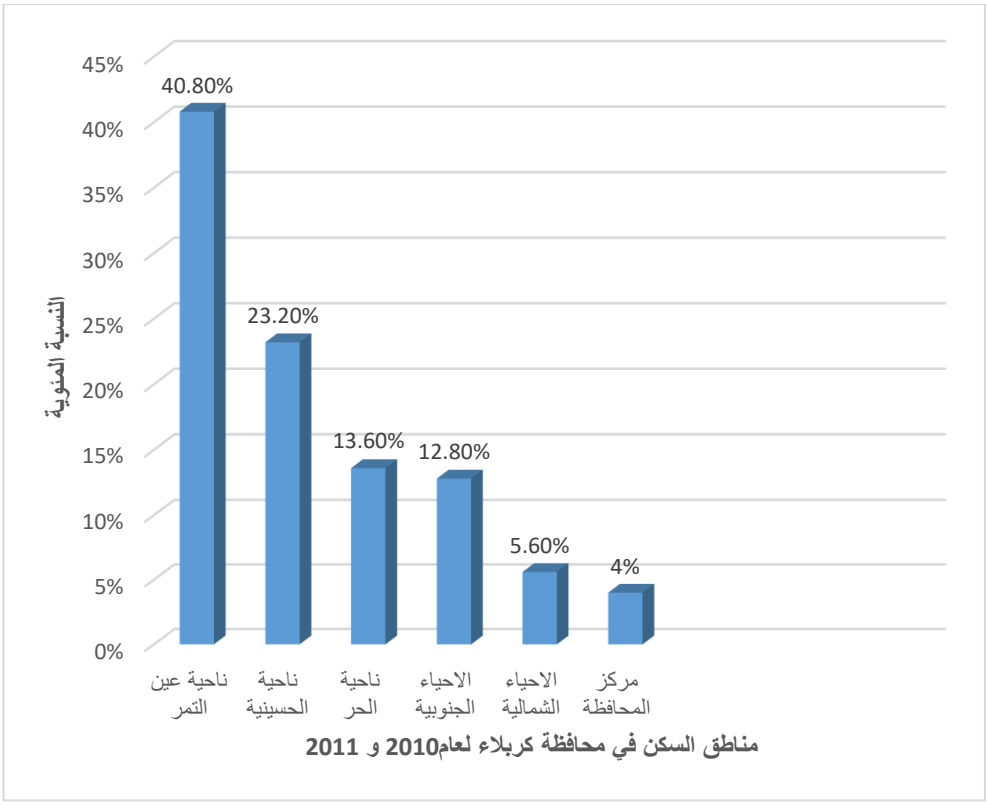
شكل (10) توزيع اللشمانيا الجلدية استنادا الى نوع القرحة



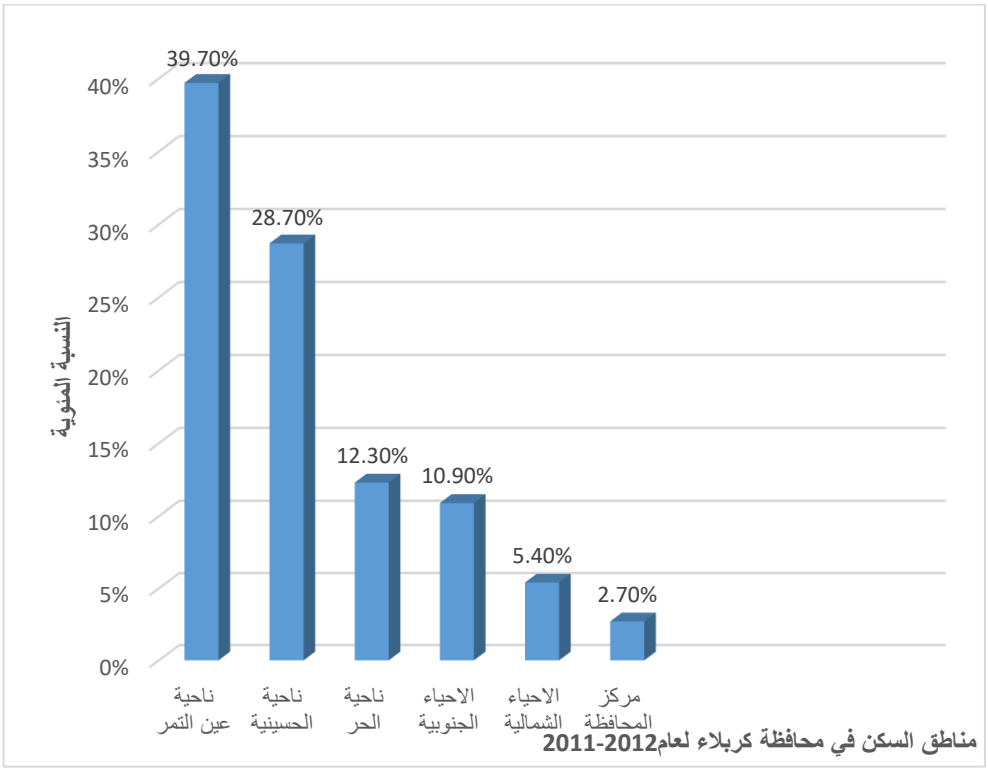
شكل (11) تشخيص الأنواع بتقنية الـ PCR للشمانيا الجلدية



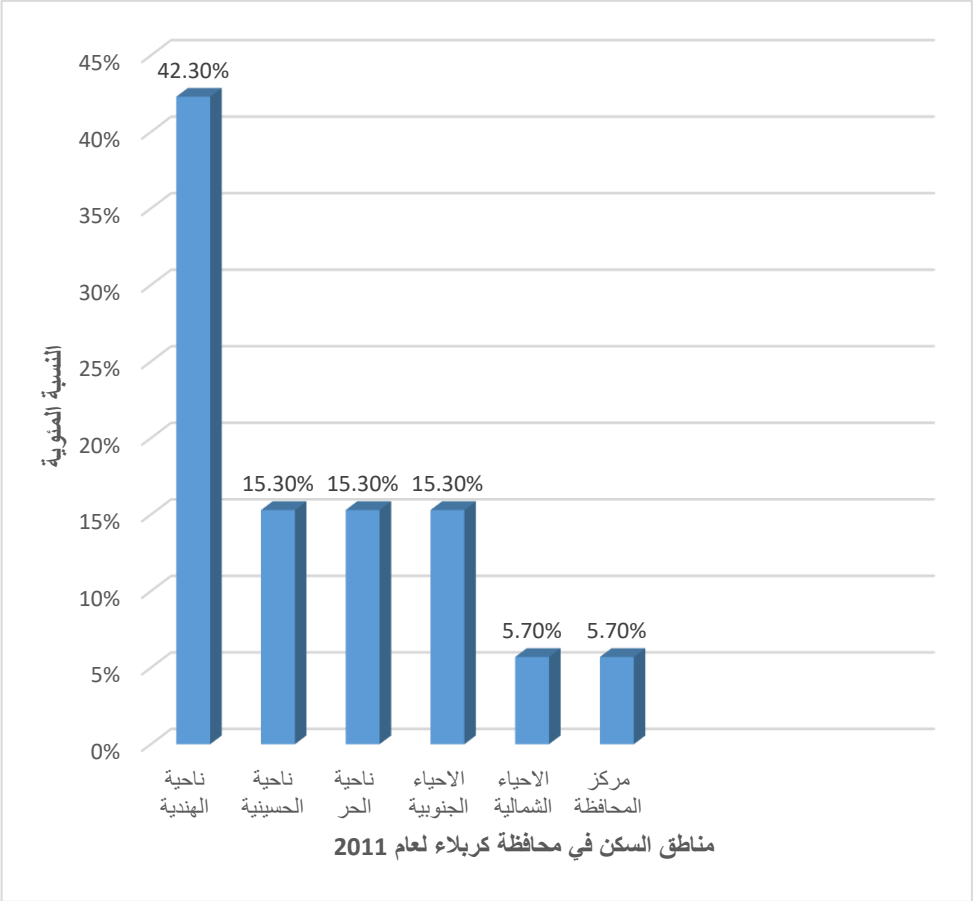
شكل (12) تشخيص الأنواع بتقنية الـ PCR للشمانيا الجلدية تبعا للجنس



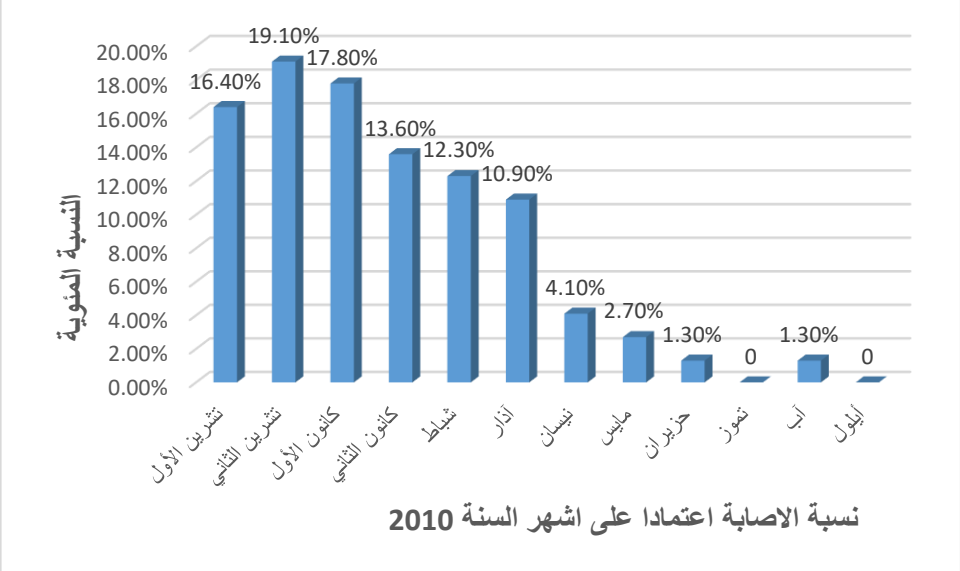
شكل (13) توزيع المصابين بداء اللشمانيّا الجلدية حسب مناطق السكن في محافظة كربلاء لعام 2010 و2011



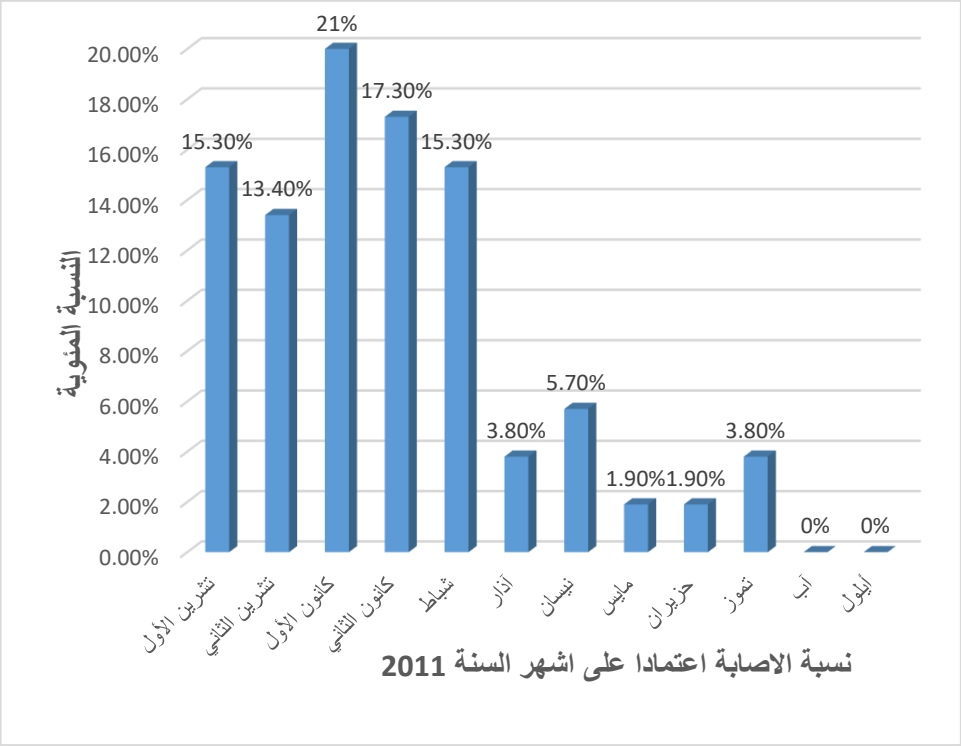
شكل (14) توزيع المصابين بداء اللشمانيّا الجلدية حسب مناطق السكن في محافظة كربلاء لعام 2010



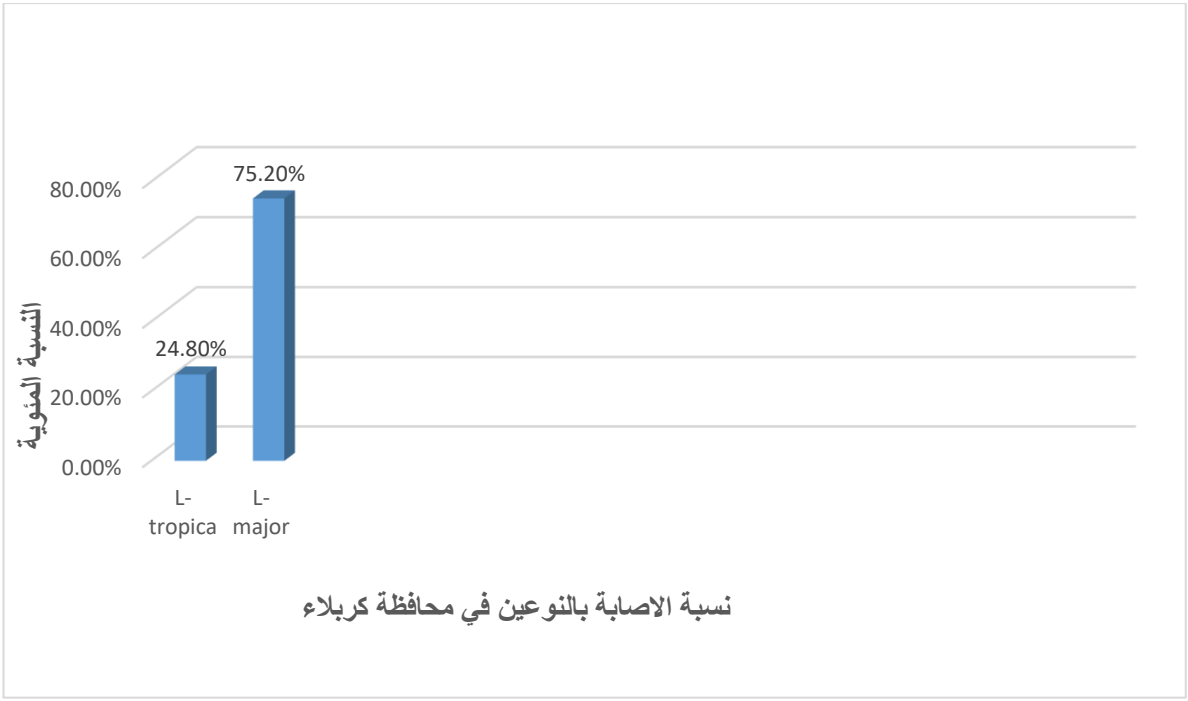
شكل (15) توزيع المصابين بداء اللشمانيّا الجلدية حسب مناطق السكن في محافظة كربلاء لعام 2011



شكل (16) توزيع المصابين بداء اللشمانيّا الجلدية حسب اشهر السنة في محافظة كربلاء لعام 2010



شكل (17) توزيع المصابين بداء اللشمانيّا الجلدية حسب اشهر السنة في محافظة كربلاء لعام 2011



شكل (18) توزيع المصابين بداء اللشمانيّا الجلدية حسب نوع الاصابة في محافظة كربلاء

Karadeniz, H., Erdem, A., & Caliskan, A. (2007). Electrochem-ical monitoring of DNA hybridization by multiwalled carbonnanotube based screen printed electrodes.
Electroanalysis
,
20
, 1932–1938. DOI: 10.1002/elan.200804270

Ann Trop Med Parasitol. 2011 Oct;105(7):485-91.

First microscopical and molecular-based characterization of Leishmania major within naturally infected Phlebotomus salehi (Diptera; Psychodidae) in Fars province, southern Iran.

Davami MH[1], Motazedian MH, Kalantari M, Asgari Q, Badzohre A, Mohammadpour I.

جينوم اللشمانيا Leishmania Genome

Nuclear Genome

ذكر(2005) Ivens *et al*., أن موضوع جينوم *Leishmania major* بدأ في عام 1994، ولم يحقق نجاحا كبيرا حينها . فالتسلسل الجيني لـ *Leishmania major* انتهى في حين بدأ التقدم في معرفة التسلسل الجيني للـ *L. braziliensis* و *L. infantum* .

ان جينوم *L. major* يحدد في 32.8 Mb موزعة على 36 زوج من الكروموسومات. في "العالم القديم" انواع اللشمانيا لديها 36 أزواج كروموسوم (Mb 2.8–0.28) . في حين أن

New World' species لديها 34 أو 35 ، مع الكروموسومات 8 و 29 و 20 و 36 ، تذوب في المجموعة *L. mexicana* و20 و 34 في المجموعة *L. braziliensis* تكون الكروموسومات خطية بين 200 و 4000 kb في الطول ، وتمتلك التيلوميرات ، ولكن لم يتم تشخيصها (Abdalla *et al*. ,2003).

ان التنوع في حجم الكروموسوم هو سمة لبعض أنواع اللشمانيا ، حتى بين الكروموسومات المتماثلة مما يعقد استخدام النمط النووي للدراسات التصنيفية. من جينوم *L. major* ، 911 RNA جين ، 39 جينات كاذبة و8272 جينات مشفرة للبروتين (36٪ من التي لها وظيفة افتراضية). الجينوم الذي يتكون من G+C يكون 59.7٪ (Ivens *et al*., 2005).

وغالبا ما تنظم جينات اللشمانيا في صفوف متوازية جنبا إلى جنب أو على الأقل أن يكون اثنين أو أكثر من نسخ تنتشر عن طريق الجينوم . وكشف تحليل التسلسل كثافة واحد من الجينات لكل kb3.5 . وقد أثبتت الدراسات السابقة أن 30٪ من الجينوم يتكون من عناصر المتكررة ، ما يقرب من نصفها هي مكررات telomeric/subtelomeric ، والباقي ان جينات المتكررة وغيرها من متواليات بسيطة متكررة (Dinse *et al*.,2001) .

لاتحتوي اي من الجينات المشفرة لبروتينات الليشمانيا والتي درست حتى الآن على الإنترونات introns ، وتبسيط تشخيص هذه الجينات في الحمض النووي الجيني DNA . وكشفت المقارنات الأولى مع الجينومات الاخرى بان هذا النظام الجيني يتم حفظه للغاية بين 30 نوع من أنواع اللشمانيا (Parvizi *et al*.,2008).

ومع ذلك، وعلى مستوى عال من تعدد الأشكال polymorphism موجود في تسلسل الحمض النووي . في الواقع Schonian *et al* (2009) اوضح أن الاختلاف في تسلسل DNA النووي يستند الى انماط محددة بين الوصلات الرئيسية للشمانيا بنسبة من 13٪ إلى 25٪، وهو مشابه لتلك التي لوحظت بين الأنواع الحيوانية التي تباعدت 10-80 مليون سنة مضت.

أشارت العديد من الدراسات إلى أن الكروموسومات اللشمانيا هي بشكل رئيسي متضاعفة diploid ، مع بعض الكروموسومات التي تظهر منفردة aneuploid (Lambson *et al*.,2000) . حتى منتصف 1990، اعتبرت اللشمانيا كائن حي مفرد الصيغة الصبغية. الآن

تم قبول صفة المضاعفة في الليشمانيا على نطاق واسع (Aransay *et al*.,2000). ان مستوى التضعيف تغير منذ ان اصبح تضخيم الجينات آلية متكررة للشمانيا المقاومة لفعل السموم او الضغوط البيئية (Yehia *et al*.,2012) .

لاحظ Dabirzadeh *et al*.,(2012) أن هذه الظواهر المتكررة نسبيا تحول اللشمانيا الى اختيارية facultative او منفردة عابرة transient aneuploids. على الرغم من أن بلمرة RNA الكلاسيكية الثلاثة (pol I, II and III) شخصت في *trypanosomatids* (Tashakori *et al*.,2006) ، اللشمانيا تظهر مزيج غير عادي من التعبير الجيني (Parvizi *et al*.,2010) . في *trypanosomatids*، بما في ذلك اللشمانيا معظم النسخ الجيني هو متعدد polycistronic (Dinse *et al*.,2001) ، تليها تفاعلات متقدمة تتضمن الاقتران للـ transsplicing وتذييل بعديد الأدينيلات polyadenylation . الجينات في البداية تنسخ الى polycistronic كبيرة بادئات الـ 60 kb RNAs او اكثر في الطول ، والتي تنشطر إلى من mRNAs monocistronic بفعل اثنين من تفاعلات التداخلات الجينية RNA تفاعلات الانشطار ، عبر الربط من 39 النيوكليوتيدات تربط اولا لتوليد النهاية 50 من كل من mRNAs، و30 leavage/polyadenylation لإنشاء النهاية 30 (Dabirzadeh et al., 2012).

تحدث كفاءة الربط 50 trans-RNA عادة في تسلسلات قصيرة يسبقها الـ polypyrimidine . ويعرف القليل حول آلية بدء النسخ في *trypanosomatids* ، وفقط عدد قليل من البادئات حددت وظيفتها (Marfurt *et al*., 2003)..

اوضح Garcia *et al* (2005) أن العمليات المختلفة لتحوير البروتين تحدث داخل اللشمانيا (phosphorylation , glycosylation and lipidation for stabilization and/or activation) . وقد وصفت ايضا عدة تحولات رئيسية ويعتقد بانها اساسية ، وهي glycosylphosphatidylinositol (GPI) إضافة anchor ، وacylation (بما في ذلك Nmyristoylation وpalmitoylation) وprenylation ، وكلها تسهل الارتباط مع الغشاء و / أو تداخلات بروتين – بروتين .

منشأ الحركة Kinetoplast DNA

kDNA هو الحمض النووي للمايتوكوندريا DNA of the Kinetoplastida يشكل 10-20٪ من DNA الكلي. وهو شبكة من DNA دائري متصل ، وتنقسم الى فئتين: The homogenous maxicircles (25-50 جزيئة من kb20) و heterogeneous minicircles (kb 0.8) ، والتي لها عدد (104) نسخة .

ان maxicircle وظيفته مشابهة اونظيره للـ mitochondrial DNA على الرغم من دوره في تحرير بقايا اليوراسيل uracil الى نيوكليوتيدات RNA المراسل (mRNA) (Tashakori *et al*.,2006).

PCR master mix reaction		Volume
PCR product		5 µL
Primers	F	2 µL
	R	2 µL
PCR water		11 µL
Total		20 µL

1. Ivens, A.(2005). The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*.Science: 309:436-42.
2. Abdalla, N.; Eldosh, A.; Abdulgani, A.; Yusif, B. and Magzoub, M.(2003). Typing and Characterization of *leishmania* sub-clinical

isolates from Nuba Mountain, West of Sudan. Infection Genetic and Evolution. 2 (4):277.

3. Dinse, N.; Schonia ,G.; Schweynoch ,C. and Presber ,W. (2001): Evaluation of different PCR assays for direct detection of *Leishmania parasites*. Poster ,In: World leish –II ,crete .

4. Parvizi, P. and Ready,p.(2008). Nested PCRs and sequencing of nuclear ITS-rDNA 400 fragments detect three Leishmania species of gerbils in sandflies from Iranian foci of 401 zoonotic cutaneous leishmaniasis. Trop Med Int Health 13:1159-71.

5. Schönian, G.; Akuffo, H.; Lewin, S.;Maasho, K.; Nylén, S.; Pratlong, F.;Eisenberger, C.;Schnur, L.and Presber, W.(2009). Genetic variability within the species *Leishmania aethiopica* does not correlate with clinical variations of cutaneous leishmaniasis. *Mol. Biochem. Parasitol.*106 , 239-248**.**

6. Lambson, B.; Smyth, A. and Barker, D.(2000). *Leishmania donovani*: Development and characterization of akinetoplast DNA probe and its use in the detection of parasites. *Exp. Parasitol.* 94 :15-22.

7. Aransay, A.; Scoulica, E. and Tselentis, Y.(2000). Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sandflies by seminested PCR on minicircle kinetoplast DNA.*Appl. Environ. Microbiol*. 66(5)1933-1938.

8. Yehia, L.; Adib-Houreih, M.; Fawzi, W.; Kibbi, A.; Loya, A. andWilson, S. (2012): DNA-based methods in the detection of *Leishmania* parasites: Field application and practicalities .Ann. Trop. Med. Parasitol.4(5):127-138.

9. Dabirzadeh, M.; Mirmohammad, H.; Baghaie, M.and Hejazi, H.(2012).Genetic polymorphism of Leishmania major in two hyper

endemic regions of Iran revealed by PPIP-PCR and ITS- RFLP. Archives Iranian Med. 15(3): 151-156.

10.Tashakori, M.; Kuhls, K.; Al-Jawabreh, A.; Mauricio, I.; Schonian, G. and Farajnia, S. (2006). *Leishmania major*: genetic heterogeneity of Iranian isolates by single-strand conformation polymorphism and sequence analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer. Acta Tropica. 98(1): 52-58.

11.Marfurt, J.; Niederwieser,I.; Makia,N.; Beck,H. and Felger,I. (2003). Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 46:115-124.

12.Garcia, A.; Kindt, A.; Quispe-Tintaya, K.;Bermudez, H.; Llanos, A. ;Arevalo, J.; Bañuls,A.,;De Doncker, S.; Le Ray, D. and Dujardin, J.(2005).American tegumentary leishmaniasis:antigen-gene polymorphism, taxonomy and clinical pleomorphism. Infect Genet Evol. 5(2):109-16.

مصدر البرايمرات :

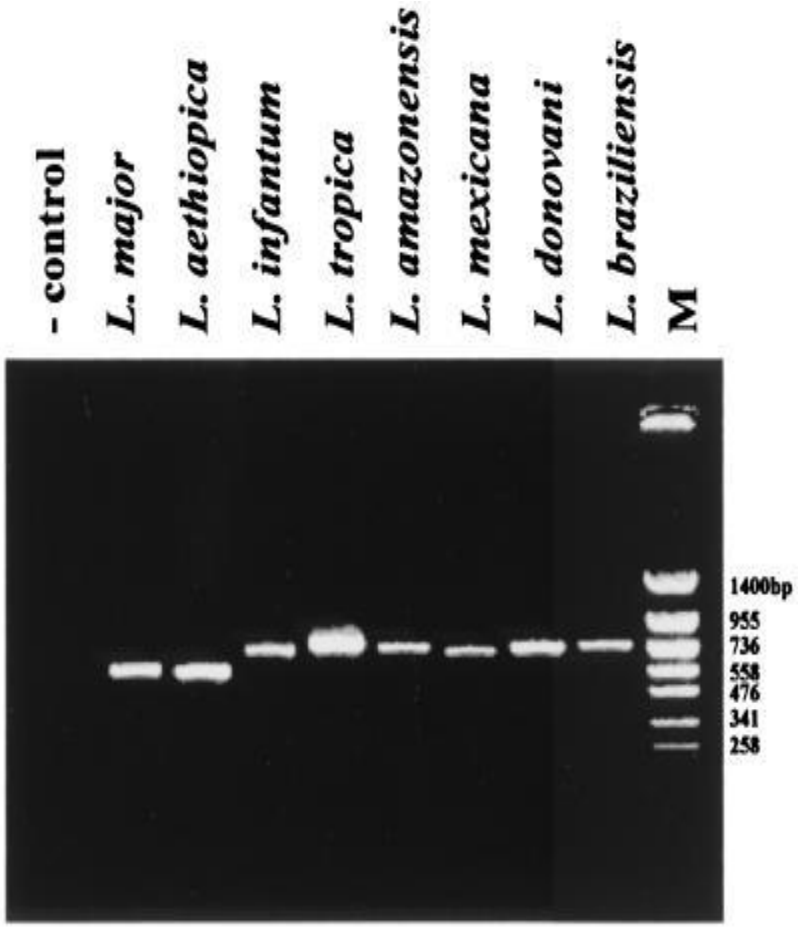
Molecular Identification of *Leishmania* Species Isolated From Human Cutaneous Leishmaniasis in Poledokhtar District, Lorestan Province, Iran

Elahe Beiranvand , Mohsen Kalantari , Hasan Ali Rastgar , Kamyar Amraee .

Jundishapur Journal of Microbiology. 2013 Aug; 6(6): e8103.

- Molecular identification of *Leishmania* species causing cutaneous leishmaniasis in Mashhad, Iran

Mahmoodi MR, Mohajery M, Tavakkol Afshari J, Shakeri MT, Yazdan panah MJ, Berenji F, Fata A.
Molecular identification of *Leishmania* species causing cutaneous leishmaniasis in Mashhad, Iran. Jundishapur
J Microbiol. 2010; 3(4): 195-200.



Summary

The study includes distribution of the Cutaneous Leishmania in some governorates in Iraq. Specimens are included cases of outpatients in hospitals like: Al-Karamah, Al-Sadir Teaching Hospital in Baghdad, Al-Hilla Teaching Hospital, Al-Hussein Teaching Hospital and Ein Altamer General Hospitals in Kerbala ,Al-Sadir Teaching Hospital in Al-Najaf , Al-Karamah and Al-Zahraa Teaching Hospitals in Wasit , Al-Diwanyia General Hospital . Al-Hussein General Hospital in Al-Nasiriya , Al-Smawa General Hospital, Al-Sadir Teaching Hospital and Al-Qurna General Hospital in Al-Basrah during October 2011 to march 2013

Cutaneous Leishmania is consider a major problem that faces the patients because it causes deformities in the infection region . The study includes 330 cases of skin ulcer in which 225 of them were microscopically positive. Parasitic growth was done using two types of cultural media NNN and RPMI-1640 .

The results have shown a considerable difference between male and female in which male was significantly exceeding 131 (%58.22) and female was 94 (%41.77) and 139 (%61.77) of outpatients from rural areas increased in numbers from outpatients of urban areas, and only (%38.22)from urban areas .

The number of ulcerations in body has exceeded infection ,that means more than one ulceration in male 83 (85%) and for female 41 (62%) , and concerning infection in three or four ulceration, it is approximately equal and normally distributed on face areas 99 and a percentage of (44%) then lower arms are 92 and a percentage of (40.80%) and the upper parts are 33 and a percentage of (14.66%). Also, one infection was recorded on the

The study shows that 46 patients in a percentage of (%20.44) having a dry infection; whereas 179 patients (%79.55) having the wet type .

For accurate diagnosis of Leishmaniaa species distributed in Iraq, PCR Was used technique and diagnosed two types of Leishmania parasite that causes the illness. A band in a length of 560 bp in 186 samples related to *Leishmania major* and the band sample was 750 bp related to 39 *Leishmania tropica.*

Through studying the samples in Kerbala City, the number infected samples were 125 for the years of 2010-2011 the actuality is (73) infection and (52) infection from 2011-2012 in a ratio of (58.4 % and % 41.6 accordingly) in different inhibited areas in the governorate in which (51) (%40.8) was in Ein Al-Tamir Suburb , and 29 cases of (%23.2) in Al-Husseinya Suburb , as well as 17 cases of (13.6%) in Al-Hur Suburb , 16 cases (%12.8) in the south quarters and 7 cases of (5.6%) in the north quarters and only 5 cases of (4%) in the city center .

The molecular diagnosis in Polymerase Chain Reaction for Kerbala governorate samples have shown 31 (%24.8) of *L .tropica* , 22 (%17.6)of them were male and 9 of (%7.2) of them were female . *L. major* was 94 of (%75.2) in which 55 of (%44) were in male and 39 of (%31.2) were in female .

The immunological study for the patients serums with *L. major* by ELISA technique has significantly shown raised values of IgG and IgM during infection in comparison with the control group , then it declines slowly after treatment in which IgG was in ratio (1811.1 ± 523.1 mg/dl) , and IgM was in ratio (166.7 ±23.6 mg/dl). Also, in *L. tropica* – IgG was in ratio (1722.1 ± 524.0mg/dl) and IgM was in ratio (25.3±182.9mg/dl) in

comparison with control specimens , and then the ratios have declined after treatment dosages with Pentostam drug.

The cellular dynamics values have shown an abstract increase in which interferon- gamma (IFN-γ) in infected patients with cutaneous *L. major* were (113.2±5.5mg/dl) which declined after treatment abstractly to (6.05±3.0mg/dl) as well as for *L tropica* (88.2±6.5mg/dl) which shows no significant abstract difference after treatment with control .

An increase appears in cytokine IL-10 that reached in *L.major* (215.0±9.8mg/dl) and after treatment was (9.02±5.1mg/dl) and in *L. tropica* was (115.0±8.8mg/dl) with no significant abstract difference after treatment with control specimen.

As a simple attempt to find a vaccine for Leishmania disease a Lipophosphoglycan was isolated and purified as known factor for promastigot stage. The vaccine injected for two groups of Bulb mice in a concentration of purified vaccine (*L.major*and *Ltropica*) to study the immunological response by detecting the Lymphocyte Transformation assay ,the Delayed Type Hypersensitivity test and the PhagocytosisIndex .

In lymphocyte transformation the ratio of *L. tropica* was % 6.5 and for *L. major* was % 12.6 and there is significant difference by $P< 0.05$ in comparison with control specimen in which its ratio was %4.7, and for Delayed Hypersensitivity test study the average foot thickness injected with vaccine and the other foot which injected with phenol-saline solution –only (0.20 ± 1.21ml) for the first group and (0.10 ± 1.45) for the second group ,and for the control group it has registered (0.44± 0.05 ml) with a considerable difference of $P< 0.05$. By calculating the ratio of Phagocytosis Index cells, it was 17% and 27.6% for the first and second

groups while for the control group it has been reaching 9.10% . Therefore, we can get advantage from these values as indicators for the rule of vaccine in the immunological response and triggering of vaccine idea for this disease .

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
& Scientific Research
University of Kerbala
College of Education for Pure Sciences
Department of Biology

Molecular and Immunological study of Cutaneous Leishmania in the middle and southern provinces

A Thesis

Submitted to the College of Education for Pure Sciences University of Kerbala, in a Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Ph. D. in Biology

By

Azhaar Mousa Jaffer Al-Mousawy

M.Sc. in University of Kerbala 2006

BSC biology in University of Kuffa 2006

Supervised by

Prof. Dr. Ali H. Al-cubacy **Prof. Dr. Mahdi H. Al-ammar**

April 2015 **Rajab 1436**