# Identification And Diagnosis Of Cutaneous Leishmaninsis By Polymerase Chain Reaction Assay (Pcr) In Najaf Alashraf Province

# تحديد وتشخيص اللشمانيا الجلدية باستخدام تفاعل سلسلة انزيم البلمرة في محافظة النجف الأشرف

***Bio. Ban Shakir Alshukur**
****Prof. Dr. Haitham Mohammed Alawadi**

**Abstract :**
**Objective:** The present study aimed to determine the effectiveness of a polymerase chain reaction (PCR) technique for identification and differentiation of the cutaneous leishmaniasis parasite in clinical sample collected from lesion exudates patients.
**Methodology:** The (115) sample were examined by smear slid preparation culture on RPMI 1640 and NNN then DNA isolation. The DNA of the promastigote were amplified by PCR including primers selected on repetitive KDNA for identification of leishmania species.The data was analyzed by using frequency and percentage.
**Results:** The PCR result showed that two species of leishmania (*L. major* with 620 bp and *L*. tropica with 800 bp) exist.
**Conclusion:** It is concluded from the present study that the PCR technique has high specificity and sensitivity during the differentiation between Cutaneous Leishmanial species in comparing with conventional methods.
**Recommendation:** The PCR technique can be use it to diagnosis and differentiation between different type of Cutaneous Leishmaniasis.

**الخلاصة :**
**الهدف:** تهدف الدراسة الحالية إلى تحديد فعالية استخدام تقنية سلسلة تفاعل الإنزيم المتبلمر PCR في الكشف والتفريق بين أنواع طفيليات اللشمانيا الجلدية في العينات السريرية المأخوذة من المصابين بطفيلي اللشمانيا الجلدية .
**المنهجية:** تم فحص العينات المأخوذة من (115) مريض مصابين بالآفة الجلدية باستخدام المسحة الزجاجية والزرع ألمختبري على الوسط ألزرعي (NNN) والتكثير على الوسط الزرعي(RPMI 1640) وأستخدم الوسائل الاحصائية من نسبة مئوية وتكرار .
**النتائج:** تم تضخيم الـ DNA في الطور أمامي السوط من العينات المأخوذة من الأوساط الزرعية بأستخدام بادئات خاصة للجين المشفر الـ DNA للبائنة الحركية المسمى( Kinetoplast kDNA) لطفيلي اللشمانيا . أظهرت الدراسة بأن هناك نوعين لطفيلي اللشمانيا الجلدية احدهما (*L. major*) ووزنها الجزيئي (620) زوجاً قاعدياً والأخرى (*L. tropica*) ووزنها الجزيئي (800) زوجاً قاعدياً في العينات المجمعة من المصابين بهذا الطفيلي.
**الاستنتاج:** نستنتج من الدراسة الحالية أن استخدام تقنية الـ PCR ذا حساسية وخصوصية عالية عند التفريق بين أنواع اللشمانيا الجلدية عند مقارنتها بالطرق التقليدية وقد بينت النتائج المستحصلة من هذه التقنية أن هنالك نوعين من طفيلي اللشمانيا الجلدية للمصابين تم التحري عنها في محافظة النجف الاشرف .
**التوصيات:** استخدام تقنية الـ PCR في التشخيص والتفريق بين انواع اللشمانيا الجلدية .

**Keyword: Identification, diagnosis, Cutaneous, Leishmaniasis, polymerase, chain, reaction .**

***University of Kufa /College of Education for Girls**
****University of Kufa /College of Education for Girls**

## المقدمة :

مازال داء اللشمانيا واحداً من اكثر الامراض المهملة على الصعيد العالمي ، ويؤثر بشكل واسع على افقر الفقراء في البلدان النامية بالدرجة الاولى . ويعد 350 مليون شخص معرضاً لخطر الاصابة بداء اللشمانيا ، في حين تقع مليون حالة اصابة جديدة سنوياً **(WHO, 2010)** .

ينجم داء اللشمانيا الحشوية Viscerral Leishmaniasis عن طفيليات معقد اللشمانيا الدونوفانية *Leishmania donovani* واللشمانيا الطفلية *Leishmania infantum* في حين يتسبب داء اللشمانيا الجلدية Cutaneous Leishmaniasis عن نوعين من اللشمانيا هما اللشمانيا المدارية *Leishmania tropica* واللشمانيا الكبيرة *Leishmania major* في حين تتداخل المراحل الاخيرة من داء اللشمانيا الدونوفانية لتكون مرض اللشمانيا الجلدية المتأخر PKDL (Post Kala-azar Dermal Leishmanoid) **(Chance, 1981)** .

الطيف السريري لداء اللشمانيا الجلدية يكون كبيراً وقد يشبه مثيله من الامراض الجلدية الاخرى مثل قرح المتطفرات Mycobacteria ulcer ،الجذام ،العدوى الفطرية ،العدوى العنقودية، السرطان ،الساركويد والقرحة المدارية ، وأن الملامح السريرية لداء اللشمانيا الجلدية تميل للتنوع بين الاقاليم وداخلها ويفتقر المظهر السريري الى النوعية في الداء نفسه وقد تكون المعالجة مكلفة وسامة فلذلك لابد من وجود هّدية تشخيصية لهذا الداء لاعطاء افضل علاج له قبل استفحاله وبائياً **(WHO, 2010)** .

تعد طرق التشخيص التقليدية كالفحص المجهري للمادة المصبوغة بصبغة كميزا هي الطريقة الوحيدة المتوفرة على مستوى الرعاية الصحية الاولية في المناطق الموبؤة ومشكلة هذا النوع من التشخيص أن جميع انواع اللشمانيا متشابهة شكلاً ولايمكن التمييز بينها في حين ان طرق التشخيص المناعية محدودة في داء اللشمانيا الجلدية بسبب انخفاض حساسيتها واختلاف نوعيتها ،أما الأعتماد على الامراض والعلامات السريرية يعد مشكلة بسبب ان عدة انواع منها تتواجد مشتركة في كلتا من اللشمانيا الحشوية والجلدية .

تستخدم اليوم تقنية سلسلة تفاعل الانزيم المتبلمر PCR في الكشف والتفريق بين انواع اللشمانيا عموماً والجلدية خصوصاً .ومن المهم أن يتم أختيار الأوساط الزرعية الملائمة في تنمية وتكثير الطور أمامي السوط Promastigote وأستهداف الجين المناسب لتضخيمه وتوليد الاف النسخ التي يمكن ان تحدد نوع ذلك الطفيلي ،وقد بينت الدراسات المختلفة في خارج العراق **(Fazaeli *et al*,. 2008)** وداخل العراق **(Abdullah *et al*., 2009)** ان الجين المشفر للـ DNA للبانية الحركية المسماة Kinetoplast DNA ( kDNA ) من مايتوكندريا طفيلي اللشمانيا في تقنية PCR ذو حساسية وخصوصية عالية .

## المواد وطرائق العمل :

تم جمع ( 115 ) عينة من المرضى المشكوك بإصابتهم بالداء للمراجعين الى مستشفى الصدر ومستشفى الحكيم للمدة من شهر تشرين الثاني لسنة 2011 الى شهر اذار لسنة 2012 وبعد اجراء التشخيص السريري ، التشخيص الميكروسكوبي Amastigot العينة المصبغة بصبغة كميزا ، طريقة الزرع بالوسط NNN و الوسط RPMI 1640 وطريقة PCR .

تم تحديد معلومات سريرية خاصة تتضمن حجم ونوع القرح بأستخدام استمارة استبيان.

تم عزل طفيليات اللشمانيا الجلدية من الافة الجلدية بعد قيام الطبيب المختص بتشخيصها وباستخدام طريقة **(الالوسي، 1979)** اذ نظفت منطقة البشرة جيدا بالكحول الاثيلي بتركيز 70% ثم تركت لتجف وغرزت حقنة نبيذة سعة واحد ملليتر تحوي على 0.2 ملليتر من محلول اللوك Locks' solution تحت الجلد في الحافة الوردية للبشرة المحيطة بالقرحة، ثم ترك المحلول وسحب بعدها مباشرة وكان مصحوبا بقليل من الدم وقد سحبت قطرات الدم بوساطة حقنة نبيذة اخرى زرع السائل المسحوب وقطرات الدم في قنينة سعة 25 ملليتراً حاوية على الوسط الزرعي الهلامي ومن ثم حفظت في حاضنة ذات درجة حرارة 26 م°، وقد تم فحصها بعد 24 ساعة من العزل للتاكد من خلوها من التلوث وبعد مرور مدة 4 –7 ايام تم فحص المزارع ورؤية الطور امامي السوط ، ومن ثم تم اخذ 0.5 مل من قناني الحالة الموجبة الى اوساط زرعية ثانوية من الوسط ثنائي الطور (NNN) واستخدم الوسط RPMI 1640 لاغراض تكثير الاطوار امامية السوط ، وحضنت بدرجة 26 م°، وكتبت على كل قنينة المعلومات الخاصة المتعلقة بكل مريض . وقد تم اخذ قطرة الدم الاخيرة التي خرجت من موقع الغرزة وعملت منها مسحة على شريحة زجاجية وصبغت بصبغة كميزا للتأكد من وجود الطفيليات ورؤية الطور عديم السوط.

عندما تم الحصول على الاطوار امامية السوط Promastigote في الوسط الزرعي من أجل التشخيص الجزيئي ، واجري أستخلاص الحمض النووي DNA بأستخدام ( kit Geneiad ) وفقاً لتوصيات الشركة المصنعة . بعد استخلاص DNA رحّل كهربائياً باستعمال جهاز Electrophorsis-isco-493-USA نقل القالب وفحص بالأشعة فوق البنفسجية UV باستعمال جهاز VILBER LOUTMAT لملاحظة وجود DNA .
وقد أجري تفاعل سلسلة انزيم البلمرة PCR التضخيم بها مع الحمض النووي Kinetoplast اللشمانيا (kDNA) بأستخدام البادئ forward (5'-GGGGTTGGTGTTAAAATAGGCC-3') والبادئ reverse (5'- CTAGTTTCCCGCCTCCGAG-3) وفقاً لتوصيات الشركة المصنعة . أجريت طريقة العمل باستعمال 25 مايكرو لتر وحسب النشرة المرفقة مع عــدة الفحص ،إذ أجريت الإضافات باستعمال PCR Microtubes .

| المكونات | الحجم | التركيز النهائي |
|---|---|---|
| Go Taq Green Master Mix | 12.5µl | 1X |
| Forward primer | 1µl | 0.1-1.0µM |
| Reverse primer | 1µl | 0.1-1.0µM |
| DNA | 5µl | 50 ng |
| Nuclease-Free Water | 19.5µl | |
| Total | 25µl | |

بعد إتمام الإضافات جميعاً طردت العينات مركزيا باستعمال جهاز Fisher scientific-0211-USA .
نقلت العينات إلى جهاز PCR sprint-Thermal-Cycler-IP20-USA وضبط برنامج عمل الجهاز وكالاتي:

| الخطوات | درجة الحرارة | الزمن | عدد الدورات |
|---|---|---|---|
| Preincubation | 94ºC | 5 min | 35-45 cycles |
| Denaturation | 94ºC | 1 min | |
| Annealing | 48ºC | 80 sec | |
| Extended | 72ºC | 1 min | |
| Extraincubation | 72ºC | 10 min | |

بعد اكتمال عمل الجهاز اجري للعينات ترحيل كهربائي .
تم الكشف عن نواتج PCR بالترحيل الكهربائي Electrophoresis بتحضير هلام الاكاروز بتركيز 2 % بأستعمال صبغة اثيديوم بروميد Ethidium bromide 0.5 مايكروغرام / مل.
النتيجة الموجبة : وجود DNA الطفيلي بحجم 800 bp & 620 bp مقارنة مع DNA ladder .

## النتائج :

تم فحص (115) مريضاً من المراجعين الى مستشفى الصدر ومستشفى الحكيم في محافظة النجف الأشرف والمشكوك بأصابتهم بداء اللشمانيا الجلدية حسب تشخيص الطبيب المختص وكانت اعمارهم تتراوح مابين 8 اشهر ولغاية 60 سنة للمدة من شهر تشرين الثاني 2011 لغاية شهر اذار 2012 . كان العدد الكلي للمصابين بالأفات الجلدية (115) مصاباً والعدد الكلي المصابين بالشمانيا الجلدية (82) ونسبة الاصابة (71.30)% .كان عدد الذكور للمصابين بالشمانيا الجلدية (39) والنسبة المئوية (47.56)% وعدد الاناث (43) (52.43)%. والجدول رقم (1) يبين عدد الحالات والمصابين بداء اللشمانيا من الذكور والاناث .

**جدول رقم (1) عدد الحالات المفحوصة والمصابة بداء اللشمانيا الجلدية**

| العدد الكلي للمصابين | العدد الكلي للمصابين بالشمانيا الجلدية | النسبة المئوية للمصابين % | عدد الذكور المصابين | النسبة المئوية % | عدد الاناث المصابات | النسبة المئوية % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 115 | 82 | 71.30 | 35 | 42.68 | 47 | 57.31 |

اظهرت النتائج بأن حجم القرح عند المصابين بالشمانيا الجلدية كان يتراوح مابين (5) الى (40) ملم قطراً. كانت اعلى نسبة مئوية للقرح التي تتراوح اقطارها من (21-30) ملم في حين كان هنالك فقط (9) قرح اقطارها اقل من 5 ملم .جدول (2) .

**جدول رقم (2) يوضح حجم القرح عند الاشخاص المصابين باللشمانيا الجلدية**

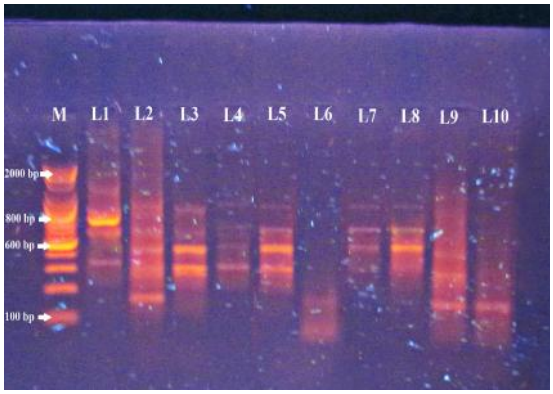
| القطر (ملم ) | العدد | النسبة المئوية % |
|---|---|---|
| ≤ 5 | 9 | 4.47 |
| 10 – 6 | 13 | 6.46 |
| 20 – 11 | 22 | 10.94 |
| 30 – 21 | 76 | 37.81 |
| 40 – 31 | 44 | 21.89 |
| > 40 | 37 | 18.40 |
| المجموع | 201 | |

اظهرت النتائج ان نسبة القرح الرطبة كان (15.85) % في حين كانت القرح الجافة تمثل النسبة الاعلى (51.21) % جدول رقم (3) .

**جدول رقم (3) نوع القرح عند المصابين باللشمانيا الجلدية**

| نوع القرح | العدد | النسبة المئوية % |
|---|---|---|
| القرحة الرطبة | 13 | 15.85 |
| القرحة الاقل رطوبة | 27 | 23.92 |
| القرحة الجافة | 42 | 51.21 |

اظهرت نتائج تشخيص طفيليات اللشمانيا المأخوذة من الاشخاص المصابين بالآفات الجلدية بأستخدام جهاز PCR بأن Lane ladder مثل 2000 bp (قاعدة نتروجينية) .




L1(*L. tropica*) L3,L5,L8(*L. major*) M (Lane ladder) .

**صورة (1) نتيجة تضخيم DNA للبائنة الحركية لطفيلي اللشمانيا الجلدية مصبوغة بصبغة Ethidium bromide تظهر الحزمة 620pb طفيلي *L.major* والحزمة 800pb طفيلي *L. tropica* .**

## المناقشة :

الطيف السريري لداء اللشمانيا الجلدي يكون كبيراً وقد يشبه مثيله في الحالات الجلدية الاخرى مثل العدوى العنقودية أو العقدية والقرح الفطرية Mycobacteria ulcer والجذام والعدوى الفطرية طريقة اوالسرطان والساركويد والقرحة ا لمدارية . وحيث أن المظهر السريري لداء اللشمانيا الجلدي يفتقر الى النوعية وذا معالجة طبية مكلفة أو سامة فأن هناك حاجة لثبات التشخيص **(WHO, 2010).**

تعد طرق التشخيص التقليدية كالفحص المجهري للمادة المصبوغة بصبغة كيمزا المأخوذة من العينات السريرية غالباً ماتعد الطريقة الوحيدة المتوفرة على مستوى الرعاية الصحية الأولية في المناطق المتوطنة بالداء ، ومشكلة هذا التشخيص ان انواع اللشمانيا جميعها هنا تكون متشابهة ولايمكن تمييز الأنواع شكلياً ،في حين ان استخدام التشخيص المناعي في داء اللشمانيا الجلدي ذو محدودية بسبب أنخفاض حساسيته وأختلاف نوعيته مثلاً طريقة تحديد النظائر الأنزيمية وعلى الرغم من أنها من أكثر الطرق التشخيصية استخداماً التي تعتمد على الترحيل الكهربائي للأنزيم متعدد المواقع الا أنها ذات تقنية صعبة وتتطلب تجهيزات متعددة مسبقة خارج الجسم الحي *In vitro* عموماً فأن استخدام التشخيص المناعي محدود في داء اللشمانيا الجلدي بسبب أنخفاض حساسيته وأختلاف نوعيته . قد يكون اختبار اللشمانيين الجلدي مفيداً في الدراسات الوبائية الا أن قيمته ضعيفة في تشخيص داء اللشمانيا الجلدي .لاتميز الاختبارات السيرولوجية ولأختبار اللشمانيين الجلدي بين العدوى السابقة والحالية .

أن التعرف على أنواع اللشمانيات المصيبة للأنسان والتي تعتمد على العلامات والأعراض السريرية تعد مشكلة متداخلة خاصة بين أنواع اللشمانيا الحشوية المتأخرة PKDL واللشمانيا الجلدية.

من هنا أصبح من الضروري تطبيق طرق تشخيص ذات خصوصية عالية كأستخدام تقنية تفاعل سلسلة البلمرة PCR ومع تقدم هذه التقنية منذ سنوات عدة فأنه قد أختبر أعداد كبيرة من الأهداف الجينية مثلاً ( ITS1 region of rRNA genes , rRNA genes , Mini-exon , Kinetoplast DNA minicircles ) وقد كان kDNA ذا حساسية تصل الى 98.7 % في تشخيص طفيلي اللشمانيا الجلدية. أضافة الى أعطائها الاف النسخ لكل خلية مقارنة بالطرق الأخرى المستخدمة بهذه التقنية **(Saovanee *et al*., 2007)**. وقد اظهرت الدراسة الحالية ومن خلال أستخدام تقنية الـ PCR في تضخيم DNA بأستخدام بادئات خاصة للجين المشفر المسمى kDNA الخاصة بعثرات طفيلي اللشمانيا بأنه قد تم الكشف عن نوعين من هذا الطفيلي الأول *L. major* ذي وزن جزيئي 620 bp والـ *L.Tropica* ذي وزن جزئي 800 bp لاتتطابق نتائج الدراسة الحالية كلياً مع ما وجده **(Fazaeli *et al*., 2008)** عند دراسته على أنواع اللشمانيا الجلدية بأستخدام طريقة kDNA – PCR في جنوب أيران والتي يبين النوع الوحيد المسجل في هذه الدراسة هو *L. major* ولم يستطع تحديد وجود *L. tropica* في أي من العينات المدروسة مما يدل على أن اللشمانيا الجلدية المتوطنة في مناطق الدراسة هي ذات أصل حيواني ZCL وقد بينت النتائج التي قام بها **(Abdullah *et al*., 2009)** في بغداد تشابهاً كبيراً مع النتيجة اعلاه والتي بينت فيها أنواع *L. major* وقد توجد في نموذجين بنسبة مؤية (7.4 %) من مجموع النماذج المستحصلة في دراسته ، وقد بين **(Mahboudi *et al*., 2001)** في دراسته التي اجريت في الأجزاء الشمالية الغربية من أيران وخاصة في مدينة مشهد أن هنالك نوعين من اللشمانيا تم التحري عن 19 عزلة *L. tropica* وعزلتين *L. major* وقد أوضح ان كلتا البؤرتين ACL والـ ZCL موجودة في محافظة مشهد . تتطابق النتائج المستحصلة من دراسة **(Mahboudi *et al*., 2001)** مع الدراسة الحالية مع الفارق بأن *L. major* هي الداء المسيطر في منطقة النجف ثلاث عزلات مقارنة بالـ *L. tropica* التي تتواجد ولكن بأعداد قليلة ويُستفاد من النتائج أعلاه أن سيطرة طفيلي اللشمانيا الجلدية ذات المنشأ الحيواني يعود أساساً الى التفاعل الشديد بين الأنسان والحيوان والناقل من ذبابة الرمل في منطقة الدراسة . وبالرغم من عدم وجود دراسة سابقة تشير الى هذه الحالة وتواجد هذا الطفيلي في الخوازن الحيوانية ( الكلاب ، القوارض ) في العراق .ونفسه بالوقت فأن ظهور *L. tropica* ذات المنشأ البشري يعود وجود حالات جديدة تم تسجيلها في الدراسة الحالية لأنتشار مثل هذا الطفيلي خاصة أن تقرير **(WHO, 2010)** يشير الى أن الأنسان هو الخازن لهذا الطفيلي ولم يشير أي اثر للحيوانات هنا الا أن التقرير أشار الى أزدياد أعداد ذبابة الرمل من النوع السرجنتية وهي المسؤلة عن سراية المرض من أنسان الى الأنسان قد يعطي أنطباعاً عن بداية ظهور L. tropica في الأماكن المختلفة من العراق . ان الأنفتاح الكبير في العراق ودخول الأعداد الكبيرة من الزائرين وخاصة من الدول المجاورة قد يكون له دور في أزدياد أعداد اللشمانيا المدارية خاصة والكبيرة عامة ، و ان الهجرة التي حدالتي حدثت خلال السنوات الماضية وخاصة عند نزوح المهجرين الى مناطق رطبة تتكاثر بها أنواع من الـ P. sergenti **(Barbier & Demenais, 2005)** قد يكون ذو علاقة في أزدياد فرصة ظهور هذا الطفيلي .

اوضحت النتائج في الجدول (1) ان العدد الكلي للمصابين بالشمانيا الجلدية (82) حالة مقارنة بالعدد الكلي للمصابين بالامراض الجلدية خلال مدة الدراسة الحالية وتمثل هذه النسبة العالية مايقارب 71% من الاصابات مشكلة صحية قد تكون محافظة النجف الاشرف تعاني منها ولو قورنت هذه النتائج مع دراسة **(كشكول، 2009 )** . ويبدو أن المرض قد عرف قديما لدى العراقيين وكانت نسبة انتشاره منخفضة لحد ما **(Pringle , 1956)** إلا أنها بدأت بالازدياد وبشكل ملحوظ خلال الثمانينات أثناء نشوب الحرب العراقية الإيرانية **(Sarhan , 1985)** ، بل أن الحالات التي سجلت في بغداد لوحدها لهذا المرض في عام 1991 وصلت إلى أكثر من خمسة أضعاف مما كانت عليه في العام السابق **(جار الله ،2000)** .

بينت النتائج ان اعداد الاناث المصابات بالشمانيا الجلدية كان اكثر من اعداد الذكور المصابين وقد يرجع السبب في كثرة مراجعة الاناث الى المراكز الصحية وذلك خوفاً من التشوهات التي قد تحصل بسبب هذه الافة وأخذ العلاجات اللازمة لها **(Fazaeli *et al*., 2008)** .

يظهر الجدول (2) ان حجم القرح ذات الاقطار (21-30) اعلى نسبة مقارنة بالقرح ذات الحجم اكبر من 5 ≤ وهذا مايمكن الاستدلال عليه من استمارة الاستبيان .

بأن المدة مابين بداية المرض ومراجعة المريض قد استغرقت مدة زمنية طويلة مما ادى الى كبر حجم القرحة .

مثلت القرح الرطبة النسبة الاعلى للأصابة باللشمانيا الجلدية وهذا مايشير الى أن المصدر الرئيسي للأصابة بداء اللشمانيا الجلدية الناجم عن اللشمانيا الكبيرة . هذه الآفات تكون متعددة بشكل متكرر لاسيما عند المواطنين غير الممنعين وتصبح متمادية بالكبر وتصاب بعدوى ثانوية .

## المصادر :


1. **الالوسي، رجاء سليمان (1979).** دراسة احتمال وجود اكثر من ضرب لطفيلي *Leishmania tropica* في العراق. رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة بغداد. 109 ص.
2. **جار ، سهى عبد الله (2000).** وبائية اللشمانية الجلدية والحشوية في القطر العراقي، رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة بغداد .
3. **كشكول، عباس حياوي (2009) .** بعض الجوانب البيئية والحياتية للحرمس الواخز Phlebotominae (Diptrea: ووبائية داء اللشمانيا الجلدية Leishmaniasis في محافظة الديوانية. رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة القادسية .
4. **Abdullah, M.Q.; Mushriq, K.A. and Tural, Y.B. (2009).** Identification of *Leishmanai* parasites in clinical samples obtained from Cutaneous Leishmaniasis patients using PCR technique in Iraq. Iraqi Journal of Science, Vol. 50,No.
5. **Barbier, D. and Demenais, F. (2005)**. Cutaneous Leishmaniasis in U.S. Military Personnel -Southwest/Central Asia, 2002-2003. *Arch. biol*.,140:135-136.
6. **Chance, M.L. (1981).** The Six diseases of WHO : Leishmaniasis.Brit. Med. J., 283: 1245- 1247.
7. **Fazaeli, A.; Fouladi, B.; Hashemi-Shahr, SM. and Sharifi, I. (2008).** Clinical Features of Cutaneous Leishmaniasis and Direct PCR-Based Identification of Parasite Species in A New Focus in Southeast of Iran.Iranian J Publ Health, Vol. 37, No. 3,pp. 44-51.
8. **Mahboudi, F.; Ablhassan.M.; Yaran, M.; Mobtaker, H. and Azizi, M. (2001).** Identification and differention of Iranian *Leishmania* species by PCR amplification of kDNA. *Scand J Infect Dis*. 33 (8): 596-8 .
9. **Pringle, G. (1956).** Kala-azar in Iraq. Preliminary epidemiological concentration. Bull. Endem. Dis.1:175 – 294.
10. **Saovanee, L.; Suradej, S.; Theerayudh, S.; Tawee, N.; Jeerapun, W. and Mathirut, M. (2007).** Identification of *Leishmania* spp. and a report of novel species in Thailand. Am J.Trop Med Hyg.76(5):902-5.
11. **Sarhan, G.M. (1985).** Epidemiological and clinical studies on Cutaneous Leishmaniasis. M.Sc.Thesis,Collegeof medicine, Baghdad University.
12. **World Health Organiztion, (2010).** Report of ameeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniaes, Geneva, 22-26 March .