Molecular and Immunological study of Cutaneous Leishmania in some Iraq provinces

دراسة جزيئية لطفيلي اللشمانيا الجلدية *Cutaneous Leishmania* في بعض محافظات العراق

* م.م أزهار موسى جعفر أ.د علي حسين الكبيسي أ.د مهدي حسين العمّار
جامعة كربلاء -كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء – كلية طب الاسنان / جامعة الكوفة – كلية العلوم
* بحث مستل من أطروحة الدكتوراه للباحث الأول

الخلاصة

تضمنت هذه الدراسة التعرف على انتشار داء اللشمانيا الجلدية والانواع الطفيلية الاخرى في بعض محافظات العراق وشملت العينات المرضى المراجعين لـ (مستشفى الكرامة و مستشفى الصدر التعليمي في محافظة بغداد ، مستشفى الحلة التعليمي ، مستشفى الحسين التعليمي ومستشفى عين التمرالعام 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 الأول 2011 الى شهر آذار 2013.

تعد الاصابة بداء اللشمانيّا الجلدية من المشاكل التي تواجه المرضى لانها تسبب تشوهات في مكان الاصابة ، شملت القرح قيد الدراسة 330 قرحة وبعد التشخيص بايجابية الفحص بالمجهر الضوئي عن طريق السائل المسحوب من حافة القرحة كان عدد المرضى قيد الدراسة (225) . تم بعدها تنمية الطفيلي في الوسط الزرعي NNN والوسط و RPMI-1640 . اظهرت نتائج الدراسة تفوق نسبة الذكور 131 (58.22%) على الاناث 94(41.77%) بفروق معنوية ، كما تفوق عدد المرضى المراجعين من المناطق الريفية 139 مريضا (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 83 (58%) ثم بقرحتين 41 (62%) ، أما حالة الاصابة بثلاث أو أربع قرح فكانت متقاربة في الاناث والذكور ، موزعة في مناطق الوجه على الاغلب 99 بنسبة (44%) ثم الاطراف السفلى 92 بنسبة (40.88 %) والعليا 33 بنسبة (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 لانواع اللشمانيا الجلدية 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 600 pb تقريباً لـ 186 عينة تعود للنوع *Lieshmania.major* و39 عينة بحزمة مقدارها 800 pb تعود للنوع *Lieshmania.tropica* .

Abstract

The study includes the Cutanous Leishmania distribution and the other parasites types in some governorates in Iraq. Specimens were included cases of outpatients hospitals like: Al-Karamah, Al-Sadir Teaching Hospital in Baghdad , Al-Hilla Teaching Hospital , Al-Hussein Teaching Hospital, Ein Altamer General Hospitals in Karbala ,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 2011 – 2010 and 2012 – 2011 from October to March .

Leishmania infection of a dermatological is a major problem that faces the patients because it causes abnormalities in the infectied area . The study includes 330 cases of skin ulcer in which 225 of them were positive at the microscopically study by taking the fluid from the ulcer margin then a parasitic growth was done using two types of cultural media NNN and RPMI-1640 . The results has 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 numbers of ulceration in body has exceeded infection in ulceration that means more than one ulceration in male 38 (85%) and for female 41 (62%) , and concerning infection in three or four ulceration, it is approximately equal and normally distributed on face areas in number of 99 and a ratio of (44%) then lower parts are in number of 92 and a ratio of (40.80%) and the upper parts are in number of 33 and a ratio of (14.66%). Also, the trunk area has recorded one infection only.

The study shows that 46 patients in a ratio of (%20.44) having a dry *infection;* whereas 179 patients (%79.55) having the wet type . For accurate diagnosis of *Leishmania*a species distributed in Iraq, we have used PCR technique and diagnosed two types of *Leishmania* parasite that causes the illness. We have got by electrophoresis a band in a length about 600 pb approximately 186 samples related to *Leishmania major* and the band sample is about 800pb related to 39 *Leishmania tropica.*

المقدمة واستعراض المراجع

داء الليشمانيات *Leishmaniasis* مرض طفيلي يتسبب عن ابتدائيات طفيلية وهو سائد في مناطق كثيرة من العالم **(1)** اذ يسود في اربع قارات ويعد من قبل منظمة الصحة العالمية (WHO) واحدا من أكبر ستة أمراض طفيلية تصيب الإنسان **(2)**. وان هناك انماطاً متعددة من هذا المرض لكل منها مظاهر سريرية مختلفة : النمط الجلدي Cutaneous (CL) والنمط الجلدي المنتشر Diffuse Cutaneous والنمط الجلدي المخاطي Mucocutaneous والنمط الاحشائي Visceral (VL) **(3)**.

يعرف داء اللايشمانيا الجلدي CL ايضا بالحبة الشرقية Oriental Sore وهو مرض خطير على الصحة العامة وله مجموعة واسعة من الأعراض السريرية كونه منتشر في أكثر 88 من البلدان ، بما في ذلك إيران (أصفهان) اذ تعد واحدة من البؤر الموبوءة من CL **(4) و (5)** . يعيش طفيلي اللشمانيا داخل الخلايا البلعمية (Macrophage) للمضيف الفقري بالشكل اللاسوطي (Amastigote) ، وفي معي حشرة ذبابة الرمل (Sandfly) *Phlebotomus* sp. بالشكل أمامي السوط (Promastigote) **(6) و (7)** .

ينتقل داء اللشمانيّا Leishmaniasis عن طريق لدغة انثى Sandfly المصابة بطفيليات الليشمانيا، اذ يصاب نحو 30 نوعاً من حشرة الحرمس عندما تاخذ وجبتها من الدم من المضائف المصابة بالطفيليات كالانسان او المضائف الخازنة مثل الحيوانات البرية مثل القوارض والحيوانات الاليفة مثل الكلاب والماعز والجمال والقطط ايضا **(8)** .

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. **(9) و (10)** .

في العراق الـ CL متوطن بشكل رئيس في جنوب البلاد و هناك حالات تحدث في ديالى وكركوك و صلاح الدين وبغداد - الكرخ وواسط و ميسان بينما أظهرت المنطقة الشمالية أيضا عن الإبلاغ عن 2000 حالة سنويا على الرغم من أن الحالات في تزايد بسبب حركة الناس عبر الحدود المفتوحة و انخفاض في المراقبة **(11)** مع إصابة البلدان الأخرى التي تحيط في العراق مثل إيران والأردن والسعودية و سورية **(12)**. وهناك نوعان من اللشمانيا الموجودة في العراق *L. tropica* و أصل داء الليشمانيات الجلديAnthroponotic Cutaneous (ACL) Leishmaniasis و *L. major* التي هي مصدر اللشمانيات الجلدي حيواني المنشأ Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis (ZCL) ومن ناحية أخرى تم الإبلاغ عن كل من ACL و ZCL كعوامل المسببة لداء اللشمانيات في العراق ولكن تم العثور ACL بشكل رئيسي في مناطق الضواحي **(13)** وكان الـ CL معروفا في بغداد في هذه المدة حيث كان يعتقد ان بغداد منطقة مستوطنة و موبوءة لهذه الأمراض في العراق **(14) و (11)** .

لقد قدّم 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 **(15)** ، 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 الخازنة و الحشرات الناقلة **(16)**. كما أن هذه 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**(17)**

وتصل حساسية تقنية الPCR إلى أعلى حد ممكن نظرياً (0.1 فيمتوغرام) / 10150.1 - X/ 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 **(18)** .

وهذه الطريقة فعالة في الدراسات الوبائية حيث يمكنها كشف الأخماج عند الأفراد الحيوانات الخازنة حيث ان تواتر هذه الأخماج أعلى بكثير من تواتر الإصابة الصريحة بداء اللشمانيا **(19)** .

إن طريقة الPCR سريعة مما يسمح بإنقاص فترة إقامة المريض في المستشفى وبالتالي إنقاص التكلفة المادية . أثبتت التقنيات الجزيئية الحديثة مثل بصمات الDNA/ PCR-dot blot /multiplex /PCR-RFLP 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 **(20)**.

طرائق العمل Methods

1- زراعة الطفيلي

جرت دراسة 225 شخصا مصابا بداء اللشمانيّا الجلدية *Cutaneous Leishmaniasis* بعد تشخيصها من قبل أطباء الاختصاص في الامراض الجلدية في مستشفيات المحافظات قيد البحث واستخدمت لتنمية الطفيلي الأوساط:

- **الوسط ثنائي الطور Biphasic Medium**

يسمى أيضا NNN Medium (Novy, MacNeal-Nicolle) وهو طوران سائل وصلب ، أستعمل لتنمية وإدامة طفيلي اللشمانيا أمامي السوط Promastigote **(21)** .

- **الوسط الزرعي الهلامي Semi-Solid Medium**

حضر الوسط الزرعي حسب طريقة **(22)** واستعمل لعزل الطفيليات من الإنسان واسترجاعها من الأنسجة الحيوانية المصابة ولإدامة الطور أمامي السوط Promastigote بعد استرجاعه في المختبر .

- **الوسط الزرعي RPM I -1640 (Roswell park medium institute)**

2- الدراسة الجزيئية Molecular Study

- **استخلاص الـ DNA**: تم استخلاص الـ DNA من الدم حسب تعليمات العدة (Kit) لشركة Geneaid

- **ترحيل الـ Agarose Gel Electrophoresis DNA**

بعد استخلاص الـ DNA اعتمدت طريقة **(23)** للتأكد من وجود إلـ DNA المستخلص .

- **تفاعل أنزيم البلمره المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR)**

وتم تجهيز البرايمر primer من شركة (Alpha DNA) الكندية . بتسلسل معين من القواعد النايتروجينية CSB1xF (CGAGTAGCAGAAACTCCCGTTCA)و CSB1xR(ATTTTTCGCGATTTTCGCAGAACG)

وباستخدام جهاز الـ PCR لنسخ جزء معين من الحامض النووي وتضخيم هذا الجزء عدديا ، حيث جرت برمجته لينجز 40 دورة تتألف كل منها من ثلاث مراحل مدة كل مرحلة 30 ثانية. جرى التسخين في المرحلة الأولى إلى الدرجة C°95 لفك ارتباط شريطي الدنا DNA، وفي الثانية إلى الدرجة C°54 لكي ترتبط البرايمر بشكل نوعي مع DNA ، وفي الثالثة إلى الدرجة °C72 لكي يقوم الإنزيم DNA Polymerase بعملية الإطالة.

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

مزج (10 µl) من الـ DNA مع (3 µl) **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 التوثيق الفوتوعرافي Photo documentation system.

تم تحليل البيانات التجريبية ، بواسطة (SPSS 10.01) لمعرفة الفروق المعنوية باستخدام 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 .

النتائج Results

1- عزل اللشمانيا الجدلية CL من القرح الجلدية في المصابين

جدول (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
χ^2 = (11.67)**		

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

Distribution of cutaneous leishmaniasis according to gender and age

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

الفئات العمرية بالسنة	الذكور	%	الاناث	%	المجموع	χ^2
اقل او يساوي سنة 1≥	4	%57.14	3	%42.85	7	*5.39
5-1	7	%58.33	5	%41.66	12	*5.47
10-5	32	%66.66	16	%33.33	48	**10.72
15-10	34	%54.83	28	%45.16	62	*4.38
20-15	21	%72.41	8	%27.59	29	**10.91
25-20	8	%47.50	9	%52.94	17	1.46 NO
30-25	7	%58.33	5	%41.66	12	**5.47
35-30	6	%42.85	8	%57.14	14	*5.39
40– 35	3	%50	3	%50	6	NO
45-40	4	%44.44	5	%55.55	9	*4.58
50-45	3	%60	2	%40	5	**7.25
≤ 50	2	%50	2	%50	4	NO
المجموع	131	%58.22	94	%41.77	225	5.49*

*= P <0.05 **= P < 0.01

3- توزيع الاصابة باللشمانيا الجلدية استنادا الى نوع السكن

Distribution of cutaneous leishmaniasis according to residence

جدول (3) يوضح توزيع الاصابة استنادا الى نوع السكن

الفئات العمرية بالسنة	المناطق الحضرية Urban Regions		المناطق الريفية Rural Regions	
	الذكور	الاناث	الذكور	الاناث
اقل او يساوي سنة 1≥	1	1	3	2
5-1	2	2	5	3
10-5	13	6	19	10
15-10	14	13	20	15
20-15	9	3	12	5
25-20	4	3	4	6
30-25	2	2	5	3
35-30	1	3	5	5
40– 35	1	2	2	1
45-40	1	2	3	3
50-45	0	0	3	2
≤ 50	0	1	2	1
المجموع	86 (%38.22)		139 (%61.77)	
χ^2	$\chi^2 = (9.71)$ **			

4 -توزيع الاصابة باللشمانيا الجلدية نسبة الى عدد قرح الإصابة

Distribution of cutaneous leishmaniasis according to number of lesions

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

الفئات العمرية بالسنة	عدد القرح Number of Lesions							
	1		2		3		4	
	الذكور	الاناث	الذكور	الاناث	الذكور	الاناث	الذكور	الاناث
اقل او يساوي سنة ≥1	3	2	1	1	0	0	0	0
5-1	5	3	2	1	0	1	0	0
10-5	18	11	12	4	1	1	1	0
15-10	26	17	7	7	1	2	0	2
20-15	11	5	9	3	1	0	0	0
25-20	3	5	3	3	2	1	0	0
30-25	3	5	3	0	1	0	0	0
35-30	6	5	0	3	0	0	0	0
40– 35	2	3	1	0	0	0	0	0
45-40	3	2	1	1	0	2	0	0
50-45	3	1	0	1	0	0	0	0
≤ 50	0	1	2	1	0	0	0	0
المجموع 225	83 %58	60 %41.9	41 %62	25 %37.8	7 %53.84	6 46.15 %	1 %33.33	2 %66.66
$\chi 2 = (12.67)$ **	(%63.55)143		(%29.33)66		(%5.77)13		(%1.33)3	

5-توزيع الخمج بداء اللشمانيّا الجلدية للوافدين الى المستشفيات على مناطق الجسم

Distribution of cutaneous leishmaniasis according to the site of lesion

جدول (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	$\chi 2 = (11.64)$ **			%100

**= P< 0.01

6 - دراسة توزيع اللشمانيا الجلدية استنادا الى نوع القرحة

Distribution of cutaneous Leishmaniasis according to type of lesion

جدول (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

7 -الدراسة الجزيئية وتشخيص انواع اللشمانيا الجلدية بواسطة تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي
Detection *Leishmania* by Polymerase Chain Reaction (PCR)

جدول (7) يبين 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
$\chi 2$	$\chi 2 = (13.07)$ **		

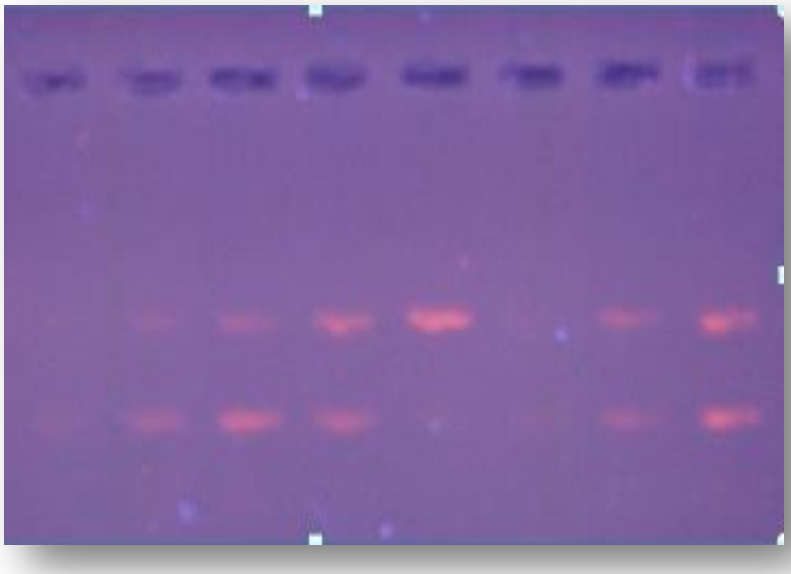
**= P< 0.01

8 -التشخيص بتقنية الـ PCR للشمانيا الجلدية بالمقارنة مع الجنس والفئات العمرية
PCR of cutaneous leishmaniasis according to and gender in different age groups

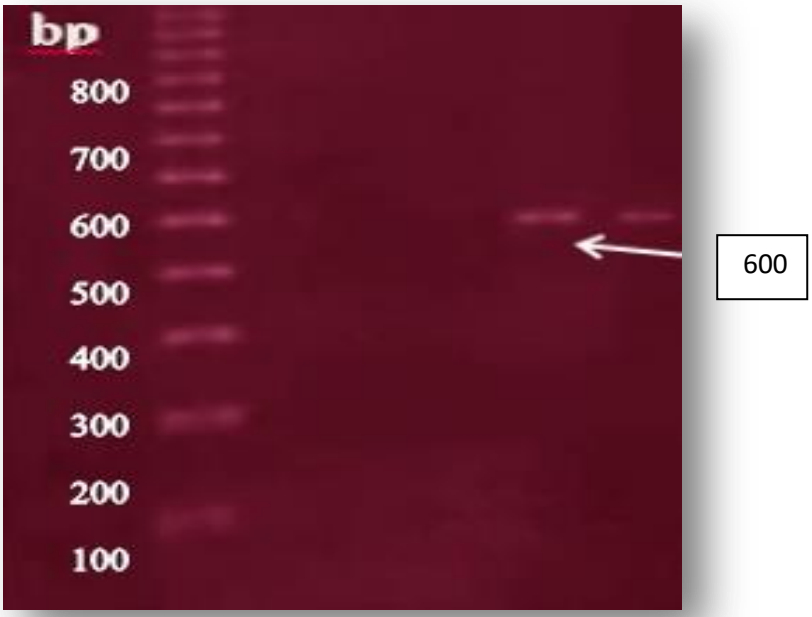
جدول (8) يوضح توزيع انواع الاصابات الجلدية المشخصة في تقنية PCR تبعا للجنس والفئات العمرية

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

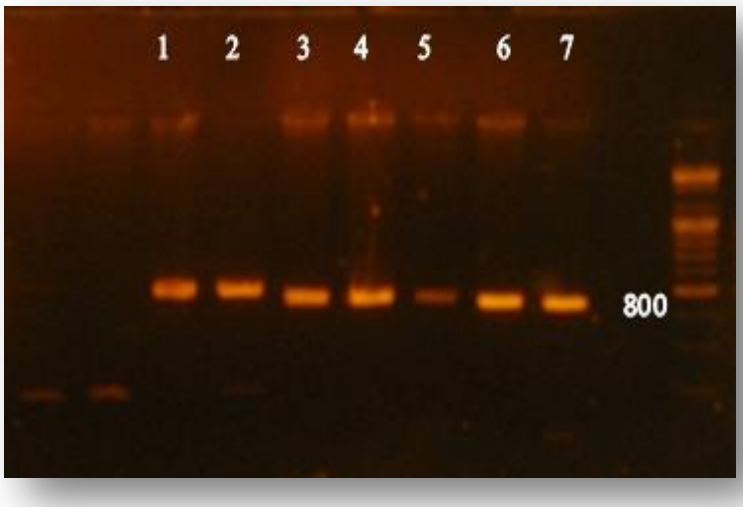
**= P< 0.01



صورة (1) توضح وجود الدنا DNA المستخلص من طفيلي اللشمانيا الجلدية من خلال ترحيله في الاكار



صورة (2) الترحيل الكهربائي لنتائج تنميط 6 عزلات من (*Leismania major*) pb600 بواسطة تقنية الـ PCR



صورة (3) الترحيل الكهربائي لنتائج تنميط 7 عزلات من (*Leismania tropica*) pb 800 بواسطة تقنية الـ PCR

المناقشة Discussion

هدف هذا البحث إلى تحديد نوع الطفيلي المسبب لداء الليشمانيات الجلدي المعزولة من المرضى المراجعين للمستشفيات في بعض محافظات القطر لكون داء الليشمانيات 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 **(24)** ، اضافة الى ان لهذا المرض وبائية غير مستقرة مع ظهور تقلبات غير متوقعة في عدد من الحالات ونسب الاصابة في كل محافظة **(25)** .

ان التشخيص الصحيح لأنواع اللشمانيا اصبح امر ضروري لتحديد التشخيص السريري وبالتالي اتباع انواع محددة من العلاجات **(26)** ، 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 الخزانات مثل الكلاب و القوارض ، استخدم المبانى الفتوحة 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 **(27)** في تكريت الذي أفاد أن وجود الحيوانات مثل قوارض الخزانات ، والكلاب ، لعب 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 (58.22 %) وعدد الاناث المصابات 94(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 (66.66%) و 34 (54.83%)على التوالي ، ان هذه النتائج متقاربة مـع ما توصل اليـه **(28)** و **(29)** ، ربمـا يرجـع هذا الى ميل الاطفال للعب خارج المـنزل لاسيما الذكور الذين هم اكثر عرضة للخمج من الإناث **(30)** و **(31)** .

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 **(32)** الذي أشار إلى أن الأطفال الأكبر سنا على ما يبدو أكثر عرضة للخطر من أي شيء آخر الفئة العمرية والرجال يبدو أقل عرضة للخطر .

وأشارت دراسات أخرى إلى انتشار كبير لداء اللشمانيا الجلدي كالعدوى في مرحلة الطفولة في باكستان و سجلت دراسة حديثة 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 اللشمانيات في الطفولة من تونس أن هذا المرض ظهر كوباء والأطفال متضررين الذين تتراوح أعمارهم من 5 أشهر 15 سنة **(33)** بينما سجلت أدنى نسبة في الفئة العمرية 10 . وعند اجراء دراسة لمعرفة تاثير السكن في انتشار وبائية داء اللشمانيا الجلدية وجد ان النسبة ارتفعت وبفارق معنوي عال بين المناطق الحضرية Urban Regions 86 مريضا (38.22%) ، والمناطق الريفية Rural Regions 139 مريضا (61.77%) .

ان موقع الإقامة ومكان العمل، والتاريخ السفر ووقت ظهور الآفات هي بيانات هامة لتحديد مواقع الاصابة التي قد تحدث . فزيادة قابلية التنقل البشري والسفر لمسافات طويلة قد يسهم في انتشار داء اللشمانيات إلى المناطق الغير متوطنة بالمرض ، هذا وقد اصبح واضحا انتشار المرض في المناطق الحضرية بعد السفر إلى إيران . أيضا غالبا ما ترتبط ظهور داء اللشمانيات مع حركة الناس في بؤر الإصابة. على سبيل المثال خلال الحرب بين إيران والعراق ، لوحظ العديد من حـــالات داء اللشـــمانيات الجلدي بين الجنـــود المرابطـــين في بـؤر نشـطة للعدوى **(34)** .

وفيما يخـص عدد القرح فان معدل الاصابة بداء اللشـمانيّا الجلدية (CL) بـقرحة واحدة هي الاكثر نسـبة 143(63.55%) . وقد تطـابقت هذه النتـــائج مـع مـا توصل اليـــه **(29)** و **(30)** وان معدل الاصابة بقرحة واحدة هو الشائع بينما تتعارض مع ما توصل اليه **(35)** في ان اغلب المرضى يحملون قرحتين ، وعزا وجود عدد من القرح إلى التعرض الى عدد من العضات بواسطة الحشرات المصابة ، وقد تم الإبلاغ عن انتشار قرح متعددة تكون أكثر تكرارا و مماثلة جزئيا إلى داء اللشمانيات الجلدي حيواني المنشأ (ZCL) والذي كان سببه *L. major* ومع ذلك ، فإنه مماثل لداء اللشمانيات 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 . اما توزيع القرح الجلدية على اجسام المصابين فان النتائج دلت هذه على ان الوجه يتضمن اكبر عدد 99 (44%) تليه الاطراف السفلى 92 بنسبة (40.88 %) والاطراف العليا 33 بنسبة (14.66%) والجذع اصابة واحدة فقط بنسبة (0.44 %) .

هذه النتائج تطابقت مع نتائج **(30)** اذ اشاروا الى ان اغلب الخمج في الوجه، وهذا قد يرجع الى تغطية اجسام الاطفال بالكامل مع بقاء الوجه معرضاً لوخز حشرة الحرمس خوفا عليهم من التغيرات الفصلية خلال فصلي الربيع والخريف **(35)** و **(36)**.

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 وكذلك في وقت ما الى عدوى ثانوية تعطي الشكل التقرحي للآفة . وكانت النتيجة الحالية بما يتفق مع **(37)** و **(38)** في العراق ، الذي ذكر هذا النوع الرطب أكثر معروفا من النوع الجاف . ولكن نتيجة مختلفة قد تم تسجيلها من قبل **(39)** الذي أشار أن هذا المرض كان أكثر شيوعا في المناطق الحضرية في العراق . ان ارتفاع عدد حالات المرض في المناطق الريفية يمكن تفسيره على ان التعرض للناقل والمضائف الخازنة ، وهذا جعلها أكثر عرضة للتعرض للعوامل المسببة لها في هذا 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 النشاط الطور السوطي المتحرك ، وهذا يتفق مع **(40)** الذي اوضح ان تشخيص داء الليشمانيات تعتمد على الكشف عن amastigotes بعد التطبيع من نخاع العظم أو الطحال الماخوذة من الحالات الحشوية أو عينات الخزعة المأخوذة من الأنسجة المصابة في الزرع . وهذه تفقد حساسيتها بسبب قلة طفيليات اللشمانيا في بعض العينات او قد تكون الطفيليات هزيلة وخارج الخلية في الغالب في بعض الابحاث التشريحية ، أوتواجه مشكلة التلوث ، قال **(41)** أن نجاح التشخيص المجهري لتحديد طور amastigotes في التحضيرات الملونة تختلف تبعا لعدد الطفيليات و خبرة الشخص الذي يقوم بفحص الشريحة. كما ان مدة حضانة طور الـ promastigot تتراوح من 2-7 يوم وفيها قد يفقد الطفيلي عدده او يقل اضافة الى تعرضه الى التلوث .

لذلك تم اللـجوء في الـوقت الحاضـر الى التشـخيص بتـقنية جـديدة **(42)** ظهرت اساليب متنوعة يعتمد المبدا الجوهري فيها على اسس كيميائية حيوية وجزيئية لتحديد انواع اللشمانيا بشكل اكثر دقة والطريقة الاكثر شيوعا في الوقت الحاضر هي التقنيات المعتمدة على الحامض النووي وذلك باستخدام تقنية PCR .

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 ng50). ولقد اعتمدت بعض الدراسات على هذه التقنية للكشف عن داء اللشمانيات الحشوي، بتحليل عينات من الدم المحيطي رغم احتوائها على عددٍ قليل من الطفيليات **(42) و (43)**.

ويعد PCR تفاعلاً سريع الإنجاز 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 **(44)** .

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 **(45) و (46)** . 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 **(47)**. واجرى العديد من الباحثين العراقيين تشخيص جزيئي باستخدام هذه PCR مؤكدين الحساسية العالية في التشخيص بهذه التقنية **(48) و (49) و (50)** .

وباستخدام تقانة PCR أظهرت نتائجنا 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 حديثة أشارت إلى الانتشار الكبير للشمانيا الكبرى بالنسبة للأنواع الأخرى من الليشمانيا **(51)** .

References

1. Ovendale, P.J.; Martin, T.I.; Webb, J.R.; Campos-neto, A.; Reed, S.G.; Badaro, R.; 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.
2. World Health Organization WHO.(2010). Communicable Disease Working Group on Emergencies, HQ Division of Communicable Disease Control, EMRO, WHO office, Baghdad. WHO Office,
3. Marquardt, W. C.;Demaree, R. S. and Grieve, R. B. (2000) . *Leishmania* and *Leishmaniasis*, In "Parasitology and Vector Biology" , Academic Press, London:50-70.
4. Mahmoodi, M.; Mohajery, M.; Afshari, J.; Shakeri, M. panah ,M. ;Berenji, F; and , A.(2010).Molecular identification of Leishmania species causing cutaneous *Leishmaniasis* in Mashhad, Iran. Jundishapur.J Microbiol. 3(4): 195-200.
5. Nadim, A. ; Azizi, F.(2000). Epidemiology and control of prevalent diseases in Iran. Iran, 2nd ed., Iran, Publications of Payam Noor University, 524-32.
6. Lainson , R. and J. J. Shaw . (1987). Evaluation , Classification and Geographic distribution in Peters , W.Killick –Kendrick R. eds. The *Leishmaniasis* in Biology and Medicine (London; Academic Press) 1 – 120 .
7. Peters , W. and R. Killick – Kendrick .(1987) . The *Leishmaniasis* in Medicine, Academic Press : London.
8. Alexander B.; Mc .Usma ; H.Candena ; Bl. Quesada , Y. Solarte , W. Roa, Bl. Travi. (1995). Evaluation impregnated bendents and cutains against *Phlebotomine* Sand flies in Valle del Cauca .Colombia .Entomol;, pp. 279 -283.
9. Asgari, Q.; Motazedian, M.H. ; Mehrabani, D. ; Oryan, A.; Hatam, G.R.; Owji, S.M.; Paykari, H. (2007) . Zonotic *cutaneous Leishmaniasis* in Shiraz Iran: a molecular, isoenzyme and morphologic aproach. J Res Med Sci. 12: 7–15.
10. Azizi, K. ; Davari, B. ; Kalantari, M. ; 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.
11. 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. degree Department of Parasitology, College of education Ibn Al-Haitham, University of Baghdad, Baghdad, Iraq.
12. World Health Organization WHO. (2008). Leishmaniasis: *cutaenous leishmaniasis* reports "consultative meeting on *cutaneous Leshmaniasi*s " WHO Headquarters, from 30 April to 2 May2007 WHO/HTM/NTD/IDM. Leishmaniasis Control Programme, Geneva. www.WHO.org.
13. World Health Organization WHO.(2009a). Leishmaniasis. Magnitude of the problem .
14. Khalaf, Chassan Jabar. (2010). Epidemiological and experimental study of *Visceral Leishmaniasis* in Wassit governorate. M.S.c thesis submitted to Collage of Veterinary Medicine, University of Al-Qadisiya . Qadisiya, Iraq.
15. Bustin, SA. (2002) . Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. J Mol Endocrinol, 29: 23−39.
16. Davami, M.H.; Motazedian, M.H.; Kalantari, M.; Badzohre, A.; Mohammadpour, I. (2011). First microscopical and molecular-based characterization of *Leishmania major* within naturaly infected *Phlebotomus salehi* (Diptera: Psychodidae) in FarsProv- ince, southern Iran. An Trop Med Pa . rasitol. 105: 1–7 .
17. Parvizi, P.; Ready, P.D. (2008) .Nested PCRs and sequencing of nuclear ITS-rDNA fragments detect three *Leishmania* species of gerbils in sand flies from Iranian foci of zoonotic *cutaneous leishmaniasis*. Trop Med Int Health. 13: 1159–1171.

18. Ghasemian, M.; Maraghi, S.; Samarbafzadeh, A.R.; Jelowdar, A. Kalantari, M. (2011) .The PCR-based detection and identification of the parasites causing human *cutaneous leishmaniasis* in the Iranian city of Ahvaz. Ann Trop Med Parasitol. 105: 209–215.
19. Mohammad, H.D.; Mohammad, H. M.;Mohsen, K.(2014) . Molecular Survey on Detection of *Leishmania* Infection in Rodent Reservoirs in Jahrom District, Southern Iran. 8(2): 139–14.
20. Fakhar, M.; Motazedian, M.H.; Asgari, Q.; Kalantari, M.; Hatam, G.R.; Akbarpoor, M.A.; 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.
21. Kagan , I. G. & L .Norman . (1970) . Normal of Clinical Microbiology . Am. Soc. Microbial. Washington . p. 479 .
22. Adler , S. & O. Theodor .(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 .
23. Sambrook,J. ; Fritsch,E.F.; and Maniatis,T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual . 2nd edition, Cold spring harbor laboratory press,cold spring Harbor, New York.
24. Mahdy, M.A.K. (2010). Molecular Characterization of *Leishmania* Species Isolated from *Cutaneous Leishmaniasis* in Yemen Plosone 5(9): e12879. doi: 10.1371/ Journal. pone. 0012879.
25. Abdullah M. Qader ; Mushriq K. Abood; Tural Y. Bakir . (2009). Identification of *Leishmania* paracites in clinical samples obtained from *cutaneous Leishmania* patients using PCR technique in Iraq . Iraqi Journal of Science, Vol.50, No.1, 2009, PP. 32 – 36.
26. Fazaeli, A.; Fouladi, B.; Hashemi-Shahri, S.M.; 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.
27. 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.
28. 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
29. Najim , R. A. (1996) .Treatment of *Cutaneous Leishmaniasis* Zinc Sulfate . Ph. D. Thesis. College of Medicine. University of Baghdad.
30. Sharifi , I.; R. Fekri , M. Aflatonian , A. Nadim , Y. Nikian and A. Kamesipour . (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.
31. World Health Organization WHO.(1984). The *Leishmaniasis* Report of a WHO Expert Commited Tech.Rep.Ser.No.701.Geneva , Switzer land :179 p.p .
32. UL- Bari,A. ; Azam,S.H. ; 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.
33. Shoaib, S.h.; Tauheed, S.h. and Hafeez,H.(2007). *cutaneous leishmaniasis*: an emerging childhood infection. J Ayub Med Coll Abbottabad .19(4)40.
34. 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.
35. 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.
36. Ardhali , S.S.; H. Motazadian ; M.R. Aflatonian ; A.R Fekri ; M. R. Ahmadi ; A. Nadim ; A. Khamesipour ; Y .Dowlat , and F. Modabber .(1997). Identification and characterization of *Leishmania* isolated school children in Bam. Southeast Iran .Iranian J. Med. Sci.22 (3) : 82 - 88.

37. Al-Mashhadany, W. (2002). Present status of *cutaneous Leishmaniasis* and its vectors in Baghdad area. M.SC. Thesis, College of science, university of Baghdad.
38. 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 Journal of Science. 53:457-463.
39. 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.
40. 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.
41. Bensoussan, E.; Nasereddin, A.; Jonas, F.; Schnur, L.; Jaffe, L. (2006). Comparison of PCR Assays for Diagnosis of *Cutaneous Leishmaniasis*, J. Clin. Microbiol. 44(4): 1435–1439.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. Brobey R.K; Mei F.C ; Cheng X. and Soong L. Comparative two-dimensional gel electrophoresis maps for promastigotes of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania major*. Braz J Infect Dis 10, 1-6, 2006.
46. Rohousova, I.; Ozensoy, S.; Ozbel, Y.; and Volf, P.(2005). Detection of species-specific antibody response of humans and mice bitten by sand flies. Parasitology 130, 493-499.
47. 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.
48. Motazedian, M.H. Mehrabani, D. Oryan, A. Asgari, Q. Karamian, M. Kalantari, M. (2006) . Life cycle of *cutaneous leishmaniasis* in Larestan, southern Iran. Iran J Clin Infect Dis. 1: 137–143.
49. 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.
50. Safaei, A.; Motazedian, M.H.; Vasei, M. (2002).Polymerase chain reaction for diagnosis of cutaneous leishmaniasis in histologically positive, suspicious and negative skin biopsies. Dermatology. 205(1): 18-24.
51. 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.