مجلة القادسية للعلوم الصرفة المجلد 19 العدد 3 سنة 2014
غيداء عباس\رنا صالح ISSN 1997-2490

*دراسة جزيئية للكشف عن طفيلي اللشمانيا الجلدي مع تحديد نوع الطفيلي والتحري عن بعض عوامل الضراوة الخاصة به

تاريخ الاستلام : 2013\10\14 تاريخ القبول : 3\12\2013

غيداء عباس جاسم رنا صالح صاحب الدفاعي
جامعة القادسية/ كلية الطب البيطري

الخلاصة

هدفت هذه الدراسة الى تقييم فعالية تقنية سلسلة تفاعل الانزيم المتبلمرPCR في الكشف عن طفيلي اللشمانيا الجلدي .وايضا تحديد نوع الطفيلي مع التحري عن ثلاثة عوامل ضراوة للطفيلي هي ,Cysteine protease lipophosphoglycan, proteophosphoglycans وبأستخدام نفس التقنية. تم جمع 55 عينة كخزعات من القروح الجلدية المشخصة سريريا كأصابات بداء اللشمانيا الجلدي للمرضى الوافدين الى مستشفى الديوانية التعليمي في محافظة القادسية للمدة الواقعة بين 1\11\2012 – 1\5\2013 ، وقد كان مدى أعمارهم بين 10-80 سنة.

تم استخلاص DNA من العينات المأخوذة وبعد تضخيمه باستخدام بادئات خاصة مصممة للجين المشفر للدنا المسمى kDNA الخاص بعترة طفلي اللشمانياالجلدي ولنوعه المسمى*Leishmania major* ولعوامل الضراوة الثلاثة الخاصة به.ثم تم تمرير نواتج الدنا المضخم في جهاز الترحيل الكهربائي لـ DNA. اظهرت النتائج بأنه تم تشخيص طفيلي اللشمانيا الجلدي في 89.09%من العينات المأخوذة ،وان الطفيلي نوع *L.major* هو الغالب على العينات وبنسبة 98% وان العوامل سابقة الذكر موجودة في جميع عينات *L.major*.

وبذلك أكدت الدراسة بأن تقنية سلسلة تفاعل الانزيم المتبلمر حساسة ودقيقة في تشخيص داء اللشمانيا الجلدي ،ويمكن ان تستخدم في التفريق بين أنواع طفيلي اللشمانيا الجلدي ولتحديد بعض عوامل الضراوة الخاصة به. وان *L.major* هو النوع الغالب لطفيلي اللشمانيا الجلدي في محافظة القادسية مع وجود عوامل الضراوة الثلاثة في كل عينات *L.major*.

المقدمة :

داء اللشمانيات Leishmaniasis هو مصطلح يطلق لوصف مجموعة من الامراض وثيقة القرابة تسببها أنواع وتحت أنواع متميزة من طفيلي اللشمانيا Leishmania وتعد من الأمراض المشتركة الخطيرة اذ تنتشر على شكل موجات وبائية في مختلف بقاع العالم عدا المناطق القطبية وأستراليا (2) وتتفاوت الأصابة بداء اللشمانيا من أفات جلدية الى أفات جلدية مخاطية (تؤدي الى تأكل الأنف والبلعوم الأنفي) أو أصابة حشوية مميتة اذا لم يتم تشخيصها في وقت مبكر (31) . وليس من السهولة أحصاء أعداد الأشخاص المصابين أو خطر انتشار داء اللشمانيا ، ولكن هناك نسب تقترح حوالي 15 مليون أصابة مع 000 400 أصابة جديدة سنويا في 67 دولة (23). وهناك عوامل تسهم في التسبب بمرض اللشمانيا وانتشاره وتمكن الطفيلي من غزو وحصول العدوى للمضائف من الثديات وتعرف هذه العوامل بعوامل الضراوة حيث تسبب الضرر لمجموعة من المضائف تكون عرضة للاصابة وعلى المستوى العلمي وجدت ان الاستجابات المناعية الفعالة تستهدف في كثير من الاحيان عوامل الضراوة حيث ان الخواص التي تمنح امكانية الضراوة تقع في عدة فئات منها القدرة على الدخول للمضيف، القدرة على التهرب من دفاعات المضيف، القدرة على النمو في بيئة المضيف، القدرة على مواجهة الاستجابات المناعية، القدرة على اكتساب المواد المغذية من البيئة داخل المضيف.

ويعد مفهوم الضراوة وعوامل الضراوة واحد من المفاهيم التي تستفيض فيها البحوث حاليا في عموم حقل الاحياء المجهرية وامراضيتها Pathogenesis و الامراض المعدية Infectious diseases التي تسببها، لما لهذا المفهوم من ارتباط وثيق على المستوى التطبيقي Practical level الخاصة بالاستجابة المناعية الفعالة Effective immune responses للعوائل Hosts من الحيوانات والنباتات كما ان فهم وتحديد عوامل الضراوة يعد هدفا للعلماء وللباحثين من اجل توفير او تحديد خارطة طريق Road map للاكتشافات المستقبلية في مجال تصميم اللقاحات Vaccine design وكيفية تفاعلها مع الآليات الدفاعية الخاصة بالعائل، و كذلك الإشارة إلى دور آليات الضراوة في العمليات الإمراضية للمرض التي تشغل العالم حاليا (6) ، ولم تعد النظرة التقليدية الضيقة المتعلقة بكون

***البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني**

الضراوة ذات صلة فقط بالكثافة العددية لهذه الطفيليـــــات (10). ومن اهم هذه العوامل التي تم تحديدها (LPG) Lipophosphoglycan و (PPG) Proteophosphoglycan و(CPA)Cysteine Protease :حيث يعتبر LPGعامل ضراوة للشمانيا متعدد الوظائف يعمل على بقاء الطفيلي على قيد الحياة وتطوره داخل مضائفه من الثديات وكذلك توفير الحماية ضد المكملات و المؤكسدات و العمل كعامل رئيسي لالتصاقه بالبلاعم وكذلك كعاملا مخففا لاستجابات المضيف عن طريق تعطيل مسارات الاشارات للبلاعم المسؤولة عادة عن تدمير مسببات الامراض داخل الخلايا للطور غير المسوط للشمانيا Amastigote(28) .وايضا الـ LPG من المحددات البروتينية السطحية تسهل عملية دخول الطفيلي الى داخل الخلايا البلعمية والتي تبدأ عندما يصبح الشكل أمامي السوط Promastigote بتماس مع غشاء الخلية ،اذ يحدث ترابطا يعتمد عليه حيث يتفاعل مع مستقبلات الخلايا البلعمية ويدخل بعدها الطفيلي الى الخلية البلعمية بعملية البلعمة ويشق طريقه الى داخل جسم المضيف كما مر ذكره سابقا (11).

ومن جانب اخر بينت نتائج دراسة جرثومية لحشرة ذبابة الرمل من قبل الباحثان حبيب وحسن (1) في مدينة البصرة في جنوب العراق ان هنالك نسبة عالية من التلوث الجرثومي في القناة الهضمية لاناث ذباب الرمل بعدد من الجراثيم البكتيرية والفطريات مما يستلزم وجود مركبات او عوامل اخرى تساعد الطفيلي على البقاء في داخل معي الحشرة. لقد اكتشف منذ وقت مبكر من هذه الوسائل ان طفيليات اللشمانيا تنطمر Embedded في كتلة من مادة ذات طبيعة هلامية Gel like material كما بينته نتائج دراسة اجراها Stierhof وجماعته (26)، وبقي مصدر او وظيفة هذه المادة الهلامية مجهولا حتى عام 2002 عندما اكتشف Rogers وجماعته الطبيعة الكيميائية لهذه المادة (PPGs) Proteophosphoglycans والتي تساهم ايضا في غلق تجويف المعي الامامي للحشرة والصمام المدي Stomodeal valve مما يعمل على اطلاق او تقيؤ Regurgitation الاطوارmetacyclic promastigotes مع عملية لسع العائل للحصول على وجبة من قبل أناث الحشرات.

وهنالك عدد من الانزيمات التي تم تحديد علاقتها بضراوة الميكروبات عموما وفي الطفيليات بصورة خاصة، وعادة الانزيمات ذات العلاقة بضراوة كائن ممرض معين تكون عادة ذات علاقة بتحطيم انسجة العائل Damaging host tissues مما يجعل العائل اكثر عرضة للاصابة بهذا الكائن الممرض (6)،ومن هذه الانزيمـــــــــــات Cysteine Protease وهو من الانزيمات المحللة للبروتين التي تصنعها اجناس اللشمانيا وتقوم بتحليل الاواصر الببتيدية Peptide bonds hydrolyze، وبذلك فانها تعمل او تزيد من امكانية تحليل البروتينات في العائل او المضيف والتي تلعب ادوارا حيوية مختلفة (25).

المواد وطرق العمل:

جرت الدراسة على 55 شخصآ مصابا باللشمانيا الجلدية موضوع الدراسة للمدة من تشرين الثاني 2012 ولغاية نهاية شهر أيار 2013 وقد تم تشخيصها سريريا من قبل أطباء الجلدية في مستشفى الديوانية التعليمي حيث اخذت العينات على شكل خزع بمقدار 1-2 مللتر من التقرحات الجلدية للمرضى المصابين ثم تم وضعها في أنابيب بلاستيكية وحفظت في المجمدة لغرض أجراء فحص الـPCR (18).

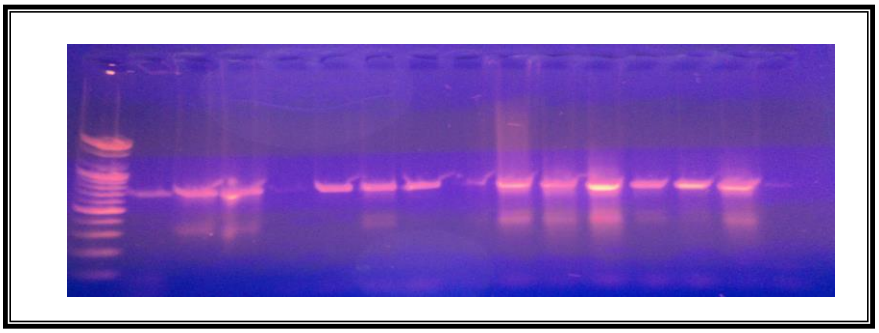
أستخلصت المادة الوراثية DNA من عينات المرضى المصابين وذلك بأستعمال AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit حسب تعليمات الشركة المصنعة وقد أستعملت بادئات ***Leishmania major*** مع تسلسلها النيوكلوتيدي والمجهزة من شركة (Bioneer,Korea) وذلك بأستخدام طريقة الـ Nested PCR (12) .

الخطوة الاولى، البادئات CSB2XF: (CGAGTAGCAGAAACTCCCGTTCA) و CSB1XR (ATTTTTCGCGATTTTCGCAGAACG) لغرض التحري عن جينات جنس طفيلي اللشمانيا. اما الخطوة الثانية ،البادئات LIR(ACTGGGGGTTGGTGTAAAATAG):13Z (TCGCAGAACGCCCCT): وذلك لغرض التحري عن جينات نوع طفيلي اللشمانيا. وقد حضر مزيج التفاعل لسلسلة البلمرة بأستعمال عدة AccuPower®PCR Pre mix و بحسب تعليمات الشركة حيث تم وضع المزيج في أنابيب ال PCR والمجهزة في العدة والحاوية على مكونات تفاعل سلسلة البلمرة وأضيفت المكونات الاخرى لمزيج التفاعل (Primers,3 µL PCR water,12 µL/ DNA ,5 µL/) ثم تغلق الانابيب وتمزج بواسطة جهاز المازج وتنقل الانابيب لجهاز PCR Thermocycler لاجراء مراحل الدورات الحرارية لتضخيم الـ DNA ،بعد ذلك أجري الترحيل الكهربائي لنواتج التضخيم على هلام الاكاروز بنسبة 1.5 % وبعد أكتمال عملية الترحيل يفحص الهلام الحاوي على ناتج PCR بأستخدام جهاز الاشعة فوق البنفسجية UV لتحديد النتائج الموجبة للعينات والمطابقة مع سلم القياس DNA Ladder. بعد عزل العينات المشخصة بانها *L.major* نعيد الخطوات السابقة وذلك لتشخيص عوامل الضراوة الثلاثة الخاصة بالدراسة وذلك باستخدام تقنية Conventional PCR حيث استخدمت بادئات كل عامل كما يلي:

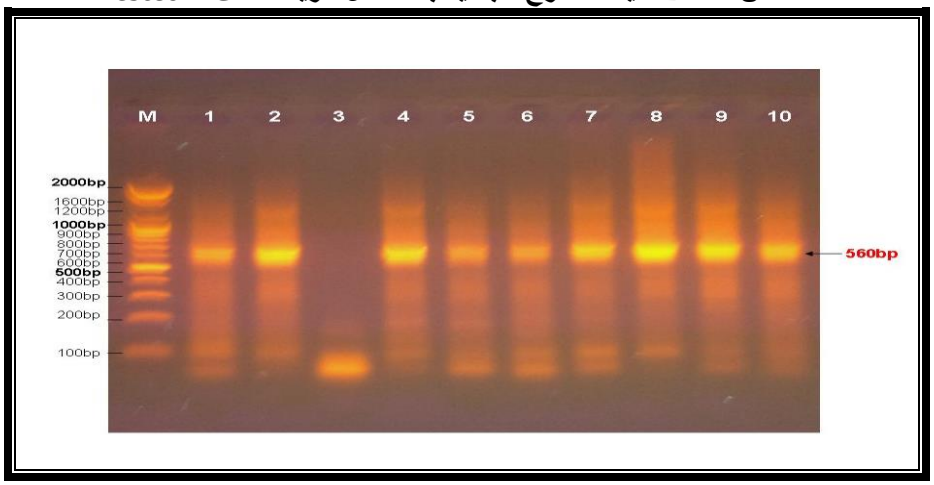
(F:ACGCATACGGCATCTTTTTC): LPG و(R:GCGAAACAGCTCATTGTTCA) ،
(F:TGGGCTTTGAAAAACCACTC):CPA و(R:CACGAGTTCTTCACGATCCA) ،
(F: CATTATGGGTGGGAAACCTG):PPG و(R:GATGGGCAAGTTAGGTGGAA) .

النتائج:-

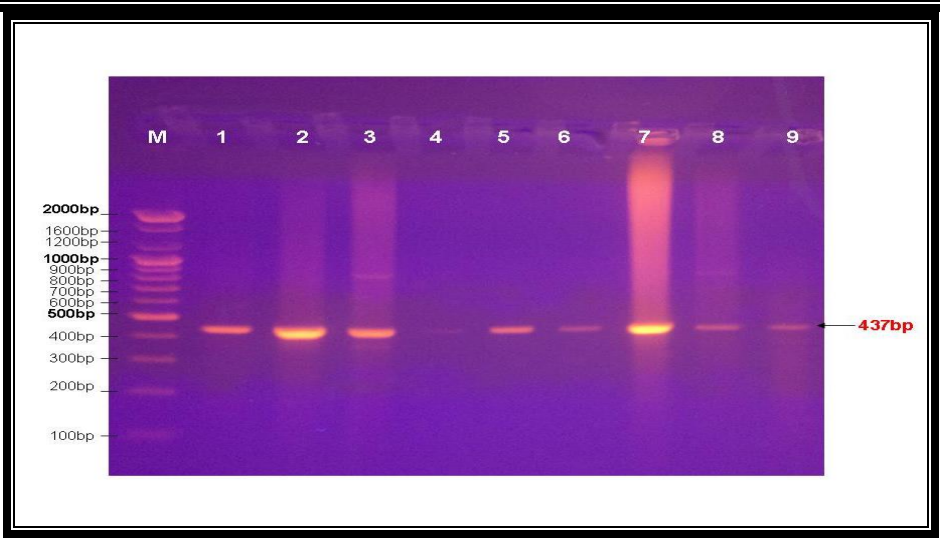
بينت نتائج أستخلاص الـ DNA لـ 55 عينة من القرح الجلدية المشخصة سريريا بأصابتها باللشمانيا الجلدية ان 49 عينة منها تحتوي على المادة الوراثية DNA أي موجبة وبنسبة 89.09% كما في الصورة (1) و6 عينات فقط كانت سالبة أي بنسبة 10.90% حيث أستخدمت طريقة Nested PCR وذلك لتحديد طفيلي اللشمانيا ونوعه وقد أظهرت النتائج للعينات الموجبة ان 47 عينة هي *L.major* أي بنسبة 95% وذلك عند ترحيلها كهربائيا على هلام الاكاروز وفحصها تحت الاشعة فوق البنفسجية UV.Light كما في الصورة (2) وعينتان فقط يعتقد انها *L.tropica* اما عن تشخيص عينات *L.major* أظهرت نتائج فحصها بوساطة تقنية Conventional PCR ان جميع هذه العينات وبنسبة 100% تحتوي على عوامل الضراوة قيد الدراسة والتي هي :- Cysteine protease كما تظهر الصورة (3) حيث يقع الوزن الجزيئي له عند الوزن الجزيئي 437 bp والعاملين Lipophosphoglycan وكذلك عامل الضراوة Proteophosphoglycan كما تظهر الصورة (4) حيث يقع الوزن الجزيئي للعامل LPGعند الوزن الجزيئي 311bp والعامل PPG عند الوزن الجزيئـي 568 bp وذلك عند ترحيلها كهربائيا على هلام الاكاروز وفحصها تحت الاشعة فوق البنفسجية UV.Light . حيث تبين الصور اللاحقة ظهور حزم DNA الخاصة باللشمانيا ونوعها وكذلك وجود حزم DNA للعوامل السابقة الذكر والخاصة بـ *L.major*والتي تؤكد التشخيص الدقيق لهذه التقنية لنوع اللشمانيا الموجودة في المنطقة.



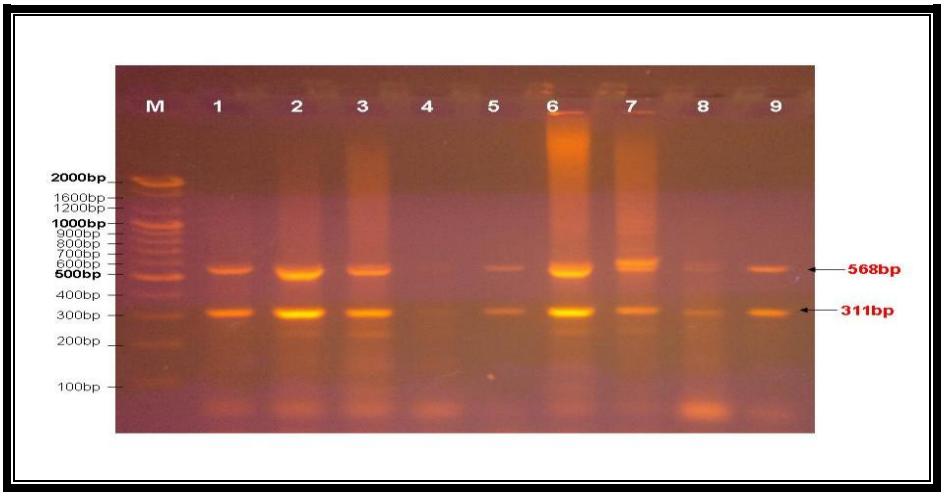
صورة (1): الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز مع صبغة (بروميد الاثيديوم) لنواتج أستخلاص DNA لعينات القرح الجلدية بأستعمال طريقة Nested PCR



صورة (2): حزم الحمض النووي DNA الخاص بـ *L.major*.



صورة (3): حزم الحمض النووي DNA الخاص بعامل الضراوة CPA \437



صورة (4): حزم الحمض النووي DNA الخاص بعاملي الضراوة311\LPG : 568\PPG

المناقشة :

يعدّ داء اللشمانيا الجلدي من الأمراض المستوطنة بأجزاء عديدة من العالم، ويتمتع حوالي 20 نوعًا من أنواع طفيلي اللشمانيا المختلفة بالقدرة على إصابة الإنسان بالخمج ويرتبط انتشار داء اللشمانيا الجلدي ارتباطًا وثيقًا بالتوزيع الجغرافي، اذ يمكن أن تنتشر الإصابة بين المناطق الجغرافية المختلفة بمعدلات مختلفة لتمتد لقرى تبعد حتى بمقدار 15 ميلاً عن مركز الإصابة، فضلاً عن ذلك ترتبط بعض أنواع طفيلي اللشمانيا بوجود الإنسان، ولذلك فهي تنتشر في المدن مثل *L.tropica* ، بينما ترتبط بعض الأنواع الأخرى عادة بدرجة أكبر بأنواع من الحيوانات ومن ثم تعدّ من الطفيليات حيوانية المصدرمثل *L.major* (30).

في الدراسة الحالية استخدمت طريقة PCR كوسيلة أساس في تشخيص الطفيلي ومن ثمّ التعرف عليه وتسجيل الاصابة به وذلك لعدة أسباب منها: ان الطرق التقليدية لتشخيص داء اللشمانيا الجلدي لا تبلغ من الحساسية والنوعية العالية بحيث يمكن الاعتماد عليها 100% فمثلا اختبار لشمان للجلد حساس للغاية ولكنه يفتقر الى التحديد وخاصة عند التشخيص في مناطق متوطن فيها المرض لانه لايمكن التمييز بين الافات الحادة من الاصابة السابقة (16).

اما التشخيص المختبري للشمانيا الجلدية فأنه عادة يتطلب اما مشاهدة طور Amastigotes او مضاعفة عزلة لطفيلي اللشمانيا من الافة (13)، ان الاساليب المستخدمة بشكل كبير في معظم مختبرات داء اللشمانيا الجلدي هي الفحص المجهريmicroscopic examination لكشطة من الافة، ومسحات لطبعات خزع Biopsy

impression smears وشريحة النسيج المرضيHistopathology section، اما طرق التشخيص التقليدية الاكثر حساسية فهي زراعة الافة بالاوساط الزرعية المناسبة وهذا لا يتوفر الا في المختبرات المرجعية او ذات الصلة بمرض اللشمانيا الجلدي وتكون حساسيتها أكثر إيجابية في 70 % فقط من الحالات الحادة عندما تؤدى على النحو الامثل (22). و قد دفعت الحاجة لأساليب أكثر حساسية لتشخيص داء اللشمانيا الجلدي بشكل صحيح الى تطوير تقنيات التشخيص المعتمدة علىDNA، ومنشأ الحركة والتي هي عضية فريدة من نوعها لـKinetoplastids، تحتوي على ما يقرب 10000 DNAs الدائري الصغير، تعرف باسم الحمض النووي لمنشأ الحركة KDNA التي تتراوح ما بين 600 و800 bp (قاعدة نتروجينية) في أعضاء جنس *Lesihmania* جعلت وفرة العدد وغيرها من الخصائص لهذه الجزيئات هدفاً لعدد من التقنيات المعتمـدة على PCR (19).

يعزى إلى التقنيات التقليدية والتي تستخدم عادة في تشخيص داء اللشمانيات إلى أنها لاتفرق بين أنواع اللشمانيات وحساسيتها تكون أقل من التقنيات الجزيئية (4,9, 24) , وتوفر تقنية Nested-PCR طريقة بديلة وسريعة وحساسة ومحددة بالنسبة إلى التقنيات التقليدية ففي هذه الطريقة يتم تشخيص العدوى بطفيلي اللشمانيا الجلدية وكذلك تحديد الأنواع التابعة لـه بنفس الوقت(3).واعتمادا على ذلك فقد استخدمنا تقنية PCR لتشخيص داء اللشمانيا الجلدي للمرضى الوافدين للمستشفى وقد أظهرت نتائج PCR لهذه الدراسة ان 89.09% من العينات كانت موجبة بينما 10.9% فقط كانت سالبة وقد كانت نسبة *L.major* في العينات الموجبة 95% بينما عينتان فقط كانتا سالبتين ويعتقد انها *L.tropica* حيث لايوجد في العراق مسببا لداء اللشمانيا الجلدي غيرهما (7, 17).

طفيليات اللشمانيا تمتلك العديد من عوامل الضراوة التي يمكن ان تعرف بأنها مجموعة من مكونات الطفيلي تعمل على بقائه داخل مضائفها من الثديات حيث تعمل على تعزيز بقاء الطفيلي وتحوير المناعة في المضيف من الثديات وتلعب هذه العوامل دوراً هاما في القدرة الامراضية لهذه الطفيليات (5)، كما تعمل على حماية الطفيلي من الاستجابة المناعية والقدرة على تكملة التصاقه وتسهيل امتصاصه وذلك لمنع نشاط الخلايا الحالة للمضيف (21).

أكد كل من(5,27,29) على دور lipophosphoglycan كعامل ضراوة لبعض أنواع اللشمانيا وخاصة *Leishmania major* فطفيلي اللشمانيا يستعمل عدة أستراتيجيات من أجل البقاء ضمن الخلايا البلعمية في الفقاريات وايضا في الانتقال عبر ذبابة الرمل وهنا يأتي دور lipophosphoglycan الموجود على السطح الخارجي للطفيلي في تحقيق ذلك، أمـا (25) فقد بين الدور الذي يلعبه Cysteine protease كعامل ضراوة أيضا لـ *Leishmania major* فهو يساعد الطفيلي على غزو الأنسجة، والبقاء على قيد الحياة في الضامة وتحوير المناعة للمضيف. وايضاً وثق الباحث (33) دور proteophosphoglycans كعامل ضراوة لطفيلي اللشمانيا ومساهمته في إصابة كل من ذباب الرمل الناقل والمضائف من الفقاريات ومنها الانسان والعمل على تفاقم داء اللشمانيا الجلدي والحشوي.

وقد بينت نتائج الدراسة الحالية باستخدام تقنية الـ Conventional PCR وجود عوامـل الضـــراوة الثلاثة السابقة الذكر(lipophosphoglycan, Cysteine protease, proteophosphoglycans) بنسبة 100% في جميع عينات الـ *L. major* وهذا يتفق مع ما ذكـــــــره (15) و(8) بالنسبة للعامل Cysteine protease وايضا بالنسبة للعامل proteophosphoglycans اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع (14), اما العامل lipophosphoglycan فقد أكد (32) وجوده في*L.major* وهذا ما وثقته ايضا الدراسة الحالية .

المصادر

1. **حبيب** ، مفيد عبد اللطيف وحسن ، كاظم صالح (2011) . دراسة جرثومية لذبابة الرمل Sand flies (Diptera: Psychodidae; Phlobotominae) في البصرة / جنوب العراق.مجلة أبحاث البصرة العدد(37) المجلد 4 ص:1-12.
2. **سليط** ،علي محمد . الصفار، زهير يونس، و العراقي ، رياض احمد .(1984). المرشد الى علم الحشرات الطبية ، مطبعة جامعة الموصل ص684.

3. Akhavan, A. Mirhendi,H. Khamesipour,A. Alimohammadian,M. Rassi,Y. Bates,P. Kamhawi, Sh. Valenzuela,J. Arandian, M. Abdoli,H. Jalali-zand, N. Jafari, R. Shareghi,N. Ghanei,M. & Yaghoobi-Ershadi,M. (2010). *Leishmania* species: Detection and identification by nested PCR assay from skin samples of rodent reservoirs. Exp Parasitol; 126(4): 552–556.
4. Ben-Ismail R, Smith DF, Ready PD, Ayadi A, Gramiccia M, Ben-Osman A, Ben-Rachid MS.(1992). Sporadic cutaneous leishmaniasis in north Tunisia: identification of the causative agent as *Leishmania infantum* by the use of a diagnostic deoxyribonucleic acid prob. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene;86:508–510.
5. Beverley, S.M. & Turco, S.J. (1998). Lipophosphoglycan (LPG) and the identification of virulence genes in the protozoan parasite Leishmania. Trends Microbiol., 6(1):35-40.
6. Casadevall, A. & Pirofski, L. (2009). Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage–response framework. J. Water and Health, 7(1): 1-17.
7. Center for Disease Control and Prevention (CDC)(2003). Cutaneous leishmaniasis in U.S. Military-personal. South West Central Asia, 2002-2003. MMWR. Mortal. Wkly. Rep., 52: 1009-1012.
8. Chaoucha, M.; Fathallah-Milia, A.; Drissa, M.; Lahmadia, R.; Ayaria, C.; Guizania, I.; Ben Saidb, M. & Ben Abderrazaka, S.(2013). Identification of Tunisian *Leishmania spp.* by PCR amplification of cysteine proteinase B (cpb) genes and phylogenetic analysis.Acta Tropica., 125: 357– 365.
9. Faber WR, Oskam L, Van Gool T, Kroon NCM, Knegt-Junk KJ, Hofwegen H, Van Der Wal AC, Kager PA.(2003). Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. Journal of the American Academy of Dermatology;49 (1):70–74.
10. Frank, S. A. & Schmid-Hempel, P. (2008). Mechanisms of pathogenesis and the evolution of parasite virulence. J. Evol. Biol., 21 :396–404.
11. 9- Gillespie, S. & Pearson, R. (2001). Principles and Practice of Clinical Parasitolog. John Wiley & Sons Ltd., Pp: 287-309.
12. Karamian M, Motazedian MH, Fakhar M, Pakshir K, Jowkar F, Rezanezhad H.(2008). Atypical presentation of Old-World cutaneous leishmaniasis, diagnosis and species identification by PCR. *J Eur Acad Dermatol Venereol* ;**22**(8):958-62.
13. Kristen, A.; Weigle, M.; Labrada, L.; Lozano, C.; Santrich, C. & Barker, D. (2002). PCR–based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishman-iasis caused by *Leishmania*. J. Clin. Microb., 40(2): 601-606.
14. Ilg, T.; Montgomery, J.; Stierhof, Y.D. & Handman, E. (1999). Molecular cloning and characterization of a novel repeat-containing Leishmania major gene,

pp g1, that encodes a membrane-associated form of proteophosphoglycan with a putative glycosylphosphatidylinositol anchor. J. Biol. Chem. , 274(44): 31410-31420.

15. Laurenta, T.; Auweraa, G.; Hidec, M.; Mertensb, P.; Quispe-Tintayaa, W.; Deborggraevea, S.; De Donckera, S.; Leclipteuxb, T.; Banulsc, A.L.; Buschera, P. & Dujardina, J.C.(2008). Identification of Old World Leishmania spp. by specific polymerase chain reaction amplification of cysteine proteinase B genes and rapid dipstick detection. Diagn. Microbiol. Infect. Dis.,63(2):173-181.
16. Luz, Z.; Pimenta, D.; Cabral, C.; Fiuza, V. & Robello, A. (2001): Leishmaniasis urbanization and low diagnosis capacity in the metropolitan region of Belo Horizonte .Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 34: 249-254.
17. Rahim, G. & Tatar, I. (1966). Oriental Sore in Iraq. Bull. End. Dis., 8:29 -54.
18. Rassi, Y.; Gassemi, M.; Javadian, E.; Rafizadeh, S.; Motazedian, H. & Doost, H. (2007). Vectors and reservoirs of cutaneous leishmaniasis in Marvdasht district southern Islamic Republic of Iran. Eas. Med. H.J.,12: 274-295.
19. Rodriguez, N.; Guzman, B.; Rodas, A.; Takiff, H.; Bloom, B.; Convit, J. (1994). Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species determination of parasites by PCR and hybridization. J. Clin. Microbiol., (9)32: 2246-2252.
20. Rogers, M. E., Chance, M.L., & Bates, P. A. (2002). The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. Parasitol., 124:495–507.
21. Medina-Ascota, E.; Kaerss, R.E.; Shwarz, H. & Russell, D.G. (1989). The promastigote surface gp63 of *Leishmania* is expressed and differentiating processed and localized in the amastigotes stage. Mol. Biochem. Parasitol., 37: 263-274.
22. Navin, T.; Arana, F.; Demerida, A.; Castillo, A. & Silvers, D.(1990). Cutaneous leishmaniasis in Guatemala: Comparison of diagnostic methods. Am. J. Trop. Med. Hyg., 42: 36-42.
23. Schmidt, D.; Roberts, L. & Janory, J.(2005). Kinetoplasta. In : Foundations of Parasitology, 7th ed. McGraw Hill Co. NY, USA pp: 76–85.
24. Shahbazi F, Shahabi S, Kazemi B, Mohebali M, Abadi AR, Zare Z.(2008). Evaluation of PCR assay in diagnosis and identification of cutaneous leishmaniasis: a comparison with the parasitological methods. Parasitology Research;103:1159–1162.
25. Silva-Almeida, M.; Pereira, B. A.; Ribeiro-Guimaraes, M. L. & Alves,C. R. (2012). Proteinases as virulence factors in *Leishmania spp*. infection in mammals. Parasites & Vectors, 5: 160.
26. Stierhof, Y. D.; Bates, P. A.; Jacobson, R.; Rogers, M.; Schlein, Y.; Handman, E. & Ilg, T. (1999). Filamentous proteophosphoglycan secreted by Leishmania promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sand fly vectors. Eur. J. Cell Biol., 78: 675–689.
27. Späth, G.F.; Epstein, L.; Leader, B.; Singer, S.M.; Avila, H.A.; Turco, S.J. & Beverley, S.M. (2000). Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 1,97(16):9258-9263.

28. Turco, S. J. & Descoteaux, A. (1992).The lipophosphoglycan of leishmania parasites.Ann. Rev. Microbiol., 46: 65–94.
29. Turco, S.J. ; Späth, G.F. & Beverley, S.M. (2001). 1Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between *Leishmania* species. Trends Parasitol., 17(5):223-226.
30. Vergel, C.; Palacios, R. & Cadena, H. (2006). Evidence for *Leishmania* (Viannia) parasites in the skin and blood of patients before and after treatment . J. Infect. Dis., 194 (4): 503–511.
31. World Health Organization WHO (1998). *Leishmania* & HIV in Grid look. Who and Joint UN program.
32. Zhang, K.; Barron, T.; Turco, S.J.; Beverley, S. M. (2004). The LPG1 gene family of *Leishmania major*. Mol. Bioch. Parasitol., 136 :11–23.
33. Rogers, M.E. (2012) The role of leishmania Proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the mammalian host. Front Microbiol., 3: 223-235.

Molecular study to detect cutaneous *leishmania* with identify the parasite species and screening for some virulence factors own

Received : 14\10\2013 **Accepted : 3\12\2013**

Rana Salih Sahib Al-Difaie **Ghyda'a Abbas Jassem**
Al-Qadisiya University / College of Veterinary Medicine

Abstract:-

This study aimed to evalute the sensitivity of the polymerase chain reaction technique (PCR) in detection of cutaneous leishmania parasite ,and identification the species of parasite,with search for the presence of three virulence factors lipophosphoglycan, Cysteine protease and proteophosphoglycans by using the same technique .Fifty-five biopsies were taken from skin ulcers which clinically diagnosed as cutaneous leishmaniasis from patients attending education AL-Diwaniyah hospital in AL-Qadisiya city for the period between 1 \ 11 \ 2012-1 \ 5 \ 2013 ,whose age ranged from (10-80) years .The DNA was extracted from samples,then amplified by using primers selected on repetitive kDNA for identification of a *Leishmania* parasite, it is *L.major* species and the above three virulence factors,after that DNA electrophoresis was done for the amplified DNA. The results showed that *Leishmania* parasite was detected in 89.09% of samples.The *L.major* species was identified in the majority of *Leishmania* parasite positive samples 98%. And the above three virulence factors were identifed in all *L.major* positive samples.There for , the study confirmed that PCR technique is a sensitive method in diagnosis of cutaneous leishmaniasis .Beside that it can be use in differentiation among different cutaneous leishmania spp. And identification of some parasite virulence factors. The study showed the L.major is the main cutaneous leishmania species in AL-Qadisiya city beside the prrsence of the three virulence factors in all *L.major* samples.

The Research is apart of on MSC. Thesis in the case of the second researcher