الجمهورية العربية السورية

جامعة حماة

كلية الطب البيطري

قسم الصحة العامة والطب الوقائي

دور الكلاب كثوي خازن للشمانيا في محافظة حماة

رسالة أعدت لنيل درجة الماجستير في العلوم الطبية البيطري اختصاص الأمراض المشتركة بين الإنسان والحيوان

إعداد

طالب الدراسات العليا

عبد الرحمن أحمد السعدي

بإشراف

المشرف العلمي

د. عون تركماني

اختصاص أمراض مشتركة

المشرف المشارك

أ.م.د **ماهر صالح**

اختصاص صحة حيوان

جدول المحتويات:

المقدمة وأهداف البحث 0

1-1-المقدمة: 1

1-2 أهداف البحث: 4

الدراسة المرجعية : 6

2-1تعريف اللشمانيا: 6

2-2 تصنيف اللشمانيا: 6

2-3 أشكال طفيلي اللشمانيا: 7

2-4 أشكال المرض سريريا: 9

2-5 انتقال داء اللشمانيا : 12

2-6 دورة الحياة : 14

2-7 عوامل الخطر الرئيسية : 15

2-8 إمراضية داء اللشمانيا: 16

2-9 وبائية داء اللشمانيا : 18

2-10 التشخيص المخبري لداء اللشمانيات : 23

2-11 الطرق التقليدية لتشخيص اللشمانيا: 26

2-12 التشخيص التفريقي: 38

2-13 المعالجة: 38

مواد العمل وطرائقه 43

3-1 جمع العينات : 43

3-2 توزيع العينات: 44

3-3 استخلاص الـDNA :... 47

4-3 تفاعل البولميراز المتسلسل المعشش:... 48

5-3 الكشف عن نواتج الـPCR بوساطة الرحلان الكهربائي في هلامة الآغاروز:........... 50

النتائـج : 54

4-1- دراسة الحالات المصابة حسب متغيري الجنس والعمر: 56

4-2- دراسة الحالات المصابة حسب متغير المكان(المنطقة الجغرافية) : 59

4-3- دراسة الحالات المصابة حسب متغير الزمن (الفصل):................................ 61

المناقشة : 65

الاستنتاجات:... 72

التوصيات: 73

الملخص باللغة العربية... 82

الملخص باللغة الأجنبية... 83

المراجع: 85

فهـرس الصور

الصورة(1)	أشكال طفيلي اللشمانيا اللاسوطي والمسوط.	16
الصورة(2)	اللشمانيا الجلدية عند الإنسان	17
الصورة(3)	اللشمانيا الجلدية عند الكلاب	17
الصورة(4)	آفة جلدية ناتجة عن الإصابة بداء اللشمانيا الجلدي المخاطي	18
الصورة(5)	الأعراض السريرية لداء اللشمانيا الحشوي عند الإنسان	19
الصورة(6)	اللشمانيا الحشوية عند الكلاب	19
الصورة(7)	تطور طفيلي اللشمانيا داخل انثى ذبابة الرمل	21
الصورة(8)	دورة حياة طفيلي اللشمانيا في الثويين الفقاري واللافقاري	23
الصورة(9)	التوزيع الوبائي لداء اللشمانيا الجلدية الوطن العربي	31
الصورة(10)	شكل طفيلي اللشمانيا بعد التلوين بصبغة غيمزا.	34
الصورة (11)	صورة توضح الكيت المستخدم الخاص باستخلاص الDNA من عينات الدم	54
الصورة (12)	صورة توضح محتويات الكيت والمحاليل المعتمدة فيه من قبل الشركة المصنعة.	55
الصورة (13)	صور توضح تطبيق الرحلان الكهربائي على هلامة الآغاروز.	59
الصورة (14)	صورة توضح النتائج الإيجابية التي تم الكشف عنها في	63

	تحليل عينات البحث.	
صورة (15)	توضح النتائج السلبية التي تم الكشف عنها في تحليل عينات البحث	63

فهـرس الأشكال

الشكل (1)	النسبة المئوية لتوزيع العينة حسب متغير الجنس	52
الشكل (2)	النسبة المئوية لتوزيع العينة حسب متغير العمر.	53
الشكل (3)	النسبة المئوية لتوزيع العينات حسب المكان.	54
الشكل (4)	النسبة المئوية لتوزيع العينات حسب الزمن.	55
الشكل (5)	النسبة المئوية لنسبة العينات (مصاب –سليم)	62
الشكل (6)	توزيع الحالات حسب متغيرات الجنس والعمر والإصابة.	64
الشكل (7)	توزيع الحالات حسب متغير المنطقة الجغرافية.	68
الشكل (8)	توزيع الحالات المصابة والسليمة حسب متغير الزمن	70

فهـرس الجداول

الجدول (1)	يوضح مجموع العينات وتوزعها حسب متغير الجنس	52
الجدول (2)	مجموع وتوزيع العينات حسب متغير العمر	53
الجدول (3)	مجموع وتوزيع العينات حسب متغير المنطقة الجغرافية.	54
الجدول (4)	مجموع توزيع العينات حسب متغير الزمان.	54
الجدول (5)	يوضح مكونات مزيج تفاعل PCR.	57
الجدول(6)	نتائج اختبار كاي تربيع لدراسة دلالة الفروق في حالات الإصابة وفقا لمتغير الجنس.	65
الجدول(7)	نتائج اختبار كاي تربيع لدراسة دلالة الفروق في حالات الإصابة وفقا لمتغير الجنس.	66
الجدول (8)	توزيع ونسبة الحالات المصابة والسليمة حسب متغير المنطقة الجغرافية.	67
الجدول(9)	نتائج اختبار كاي تربيع لدراسة دلالة الفروق في حالات الإصابة وفقا لمتغير المكان.	68
الجدول (10)	توزيع الحالات المصابة والسليمة حسب متغير الزمن.	70
الجدول (11)	نتائج اختبار كاي تربيع لدراسة دلالة الفروق في حالات الإصابة وفقا لمتغير الزمن.	71

جدول الاختصارات

الاسم بالانكليزية	الاسم العربي	الاختصار
Leishmania	داء اللشمانيا	**L.**
World Health Organization	منظمة الصحة العالمية	**WHO**
Cutaneous Leishmaniasis	داء اللشمانيا الجلدي	**CL**
Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis	داء اللشمانيا الجلدي حيواني المنشأ	**ZCL**
Anthroponotic Cutaneous Leishmaniasis	داء اللشمانيا الجلدي بشري المنشأ	**ACL**
Mucocutaneous Leishmaniasis	داء اللشمانيا الجلدي المخاطي	**MCL**
Visceral Leishmaniasis	داء اللشمانيا الحشوي	**VL**
Polymerase Chain Reaction	تفاعل البوليميراز المتسلسل	**PCR**
Acid Phosphatase Enzymes	أنزيمات الفوسفات الحامضية	**APE**
Deoxynuleoside triphosphates	ثلاثي فوسفات اليوكسي نوكليوزيد	**DNTP**
Deoxyribonucleic acid	الحمض النووي الصبغي	**DNA**
Immunofluorescence assay	اختبار التألق المناعي	IFAT

test		
Internal transcribed spacer	فواصل النسخ الداخلية	ITS
Kinetoplast deoxyribonucleic acid	منشأ الحركة للحمض النووي الصبغي	KDNA
Random amplified polymorphic DNA	تضخم الحمض النووي بأشكال متعددة عشوائيا	RAPD
restriction fragment length polymorphism	تعدد أشكال أطوال الشدف المتقطعة	RFLP
Tris borate EDTA buffer	محلول منظم لحمض البوريك والقاعدة الثلاثية وحمض الايثيلين ديامين رباعي الأسيتيك	TBE
Revolutions per minute	دورة في الدقيقة	RPM
Glycoprotein63	غليكوبروتين 63	GP63
Base pair	زوج أساسي	BP
(Novy–MacNeal–Nicolle medium	اختصار لمستنتبت نوفي ماكنيال نيكول	NNN
Roswell Park Memorial Institute	وسط معهد روسيل بارك التذكاري	RPMI 1640

الفصل الأول

Chapter One

المقدمة وأهداف البحث

Introduction & research objectives

1-1-المقدمة Introduction:

اللشمانيا: هي طفيليات من الأوالي ذات أهمية طبية وبيطرية كبيرة تنتقل إلى مضيف حساس عن طريق ذبابة الرمل الفاصدة ويعتبر من أخطر الأمراض المشتركة بين الإنسان والحيوان فهو مرض حيواني المنشأ يمكن أن يسبب التهابات ومشاكل خطيرة في جسم الإنسان تصل أحيانا لتهديد حياة المريض. وكذلك تعتبر الكائنات المضيفة لداء اللشمانيا مهددة بالموت في حال الإصابة بها (وخاصة القوارض والكلاب) (Ridley, 2004).

ومن المعلوم أن منطقة البحر الأبيض المتوسط هي من المناطق الموبوءة والتي يستوطن بها داء اللشمانيا ولقد عرف تاريخيا أن مدينة حلب السورية هي موطن هذا الوباء حيث سميت الإصابة الجلدية الناجمة عن هذا الطفيلي بعدة أسماء كان منها (حبة حلب) و (لدغة حلب) (حبة السنة) (الحساني، 1994).

وحتى وقت مضى فيما يقارب منتصف الثمانينات من القرن الماضي اقتصرت معظم الإصابات على مدينة حلب والقرى المجاورة ومع نهاية الثمانينات من القرن الماضي بدأت تظهر حالات إصابات في سوريا امتدت جنوبا حتى حدود مدينة حمص وسط سوريا (دعبول، 2009).

ويعتبر المضيف الأساسي للشمانيا هي ثدييات من رتب آكلات اللحوم كالكلاب والقطط والرئيسيات كالبشر والقرود وذات الحافر كالخيول والقوارض كالفئران والجرذان والجرابيات كالأبسوم (Ashford, 1996).

لداء اللشمانيا أنواع عدة أصبحت معروفة في الوقت الحاضر هي اللشمانيا المدارية (الجلدية واللشمانيا البرازيلية (اللشمانيا المخاطية الجلدية) واللشمانيا الحشوية وتلعب حشرة ذبابة الرمل (sand

fly) دورا هاما في نقل المرض وحتى دورة حياته حيث ثبت أن هناك حوالي 20 نوع من ذباب الرمل الفاصد يعتبر ناقلاً أساسياً للمرض. (Ashford, 2000; Desieux, 2004; Pearson, 2000)

تقوم أنثى ذبابة الرمل بنقل العدوى بالطفيلي بعد أن تصاب هي نفسها بطفيلي اللشمانيا أثناء امتصاصها للدم الملوث من أحد الثدييات وخلال فترة (4-25) يوم تستمر عملية النمو للطفيلي داخل ذبابة الرمل (sand fly) حيث تتعرض لتحول أساسي نحو الشكل الممشوق (promastigote) وتتكاثر أعداد كبيرة من هذه السوطيات بالانقسام المتوسط ويستمر التكاثر في المعي المتوسط للذبابة ثم ينتقل إلى البلعوم وتجويف الخد للذبابة ويحصل انتان شديد في بلعوم الذبابة بين اليوم السادس والتاسع من تاريخ تناول وجبة الدم المصابة وإن أي تعرض للدغ من قبل الذبابة خلال تلك الآونة سوف يفضي للإصابة اللشمانيا.(Vidyashankar, 2009)

أما كمستودعات للعدوى بداء اللشمانيا بدأت بعض الأبحاث تعتمد مقولة أن الكلاب أحد أهم الخوازن الرئيسية لداء اللشمانيا ومع تزايد عملية تربية الحيوانات الأليفة ضمن المنازل أصبحت الكلاب تلعب دورا هاما في نقل الإصابة للإنسان سواء في داء اللشمانيا الحشوي أو داء اللشمانيا الجلد. (Gomes *et al.*, 2007)

وبشكل عام فإن الكلاب تفي بالمواصفات المطلوبة لتكون مستودعات فعالة للشمانيا. (Dantas-Torres and Branda, 2006)

ونظراً لعلاقته الوثيقة مع البشر فقد اعتبر الكلب الأليف (المنزلي) مساهم ومنذ فترة طويلة كخازن رئيسي وعامل أساسي في نقل المرض للإنسان وذلك في الصين وحوض البحر المتوسط والأمريكيتين. (Ashford, 1996; Moreno and Alvar, 2002; Desjeux, 2004)

وعلى اعتبار أن الكلاب تتواجد دائماً بجانب المنازل أو حتى يمكن أن تعيش ضمنها مع البشر فهذا يساعد على استمرارية دورة انتقال العدوى المنزلية للإنسان (Branda, 2006).

ويمكن للكلاب أن تحمل الإصابة باللشمانيا دون ظهور أعراض سريرية واضحة عليها لسنوات أو حتى طول مدة حياتها. (Alvar *et al.*, 2004)

وعلى الرغم أن هناك بعض سلالات الكلاب مثل كلب الصيد إيبيزان Ibizian hounds أكثر مقاومة للمرض من غيرها ولكن غالبا ما تكون الكلاب عرضة للإصابة باللشمانيا (Moreno and Alvar, 2002; Solano-gallego *et al.*, 2000)

ففي المناطق التي تستوطن فيها الإصابة باللشمانيا الحشوية حيوانية المنشأ غالباً ما تكون نسبة إصابة الكلاب مرتفعة مع وجود نسبة كبيرة منها لا تظهر عليها أي أعراض سريرية (Dantas-Torres, 2006a) وكانت اللشمانيا الحشوية infantum zymodeme MON-1 المعزولة من الكلاب سائدة في معظم الحالات في حوض البحر الأبيض المتوسط وثبت أن الكلاب المصابة هي مصادر العدوى لذبابة الرمل الفاصد من نوع longipalpis. (Pratlong *et al.*, 2004)

وحسب منظمة الصحة العالمية فإن إقليم شرق المتوسط يمثل 80% من حالات داء اللشمانيات الجلدي المبلغ عنها في جميع أنحاء العالم ويتوطن داء اللشمانيات الحشوي بشدة في العراق والصومال والسودان واليمن. (WHO, 2003)

ويظهر على الإنسان والكلاب طيفا واسعا من العلامات السريرية من جراء الإصابة بداء اللشمانيا حيث تتراوح من عدم الظهور إلى داء حشوي قاتل، حيث تتضمن العلامات السريرية تضخم في العقد اللمفاوية والكبد والطحال جراء غزو الطفيلي للجهاز الشبكي البطاني والخلايا اللمفاوية والبلعمية وقد يحدث الموت نتيجة الإصابة بأمراض أخرى مصاحبة للشمانيا او نتيجة الإصابة بالفشل الكلوي. (Chappuis *et al.*, 2007)

نتيجة لاختلاف معدل تسارع اكتشاف أنواع طفيليات اللشمانيا ظلت طرائق العلاج والوقاية من هذا الداء بطيئة نسبيا على مدى القرن العشرين إذ لا توجد لقاحات متوفرة لمجابهة العدوى ولا أدوية وقائية وذلك بسبب تعقيد الاستجابة المناعية للإصابة باللشمانيا. (Duncan *et al.*, 2014)

2-1 أهداف ومبررات البحث Objectives of study:

يهدف البحث إلى التقصي عن داء اللشمانيا والذي يعد من أخطر ثلاث أمراض في العالم وذلك من خلال الثوي الخازن والذي يعد مصدراً مهملاً للمرض في محافظة حماة لتكوين صورة كاملة عن المرض وواقع انتشاره مما يؤمن أساسا في المستقبل لتأمين خطط فعالة لمكافحة اللشمانيا من خلال متابعة طرق انتقالها ونظراً لقلة الدراسات حول داء اللشمانيا في محافظة حماة حيث سبق أن تمت دراسة انتشارها عند البشر (الحنبظلي، 2018) فدراستنا هذه هي الأولى من نوعها لإعطاء صورة واضحة عن انتشار مرض اللشمانيا بين الكلاب التي تعد عامل مهم في نقل المرض للإنسان ويهدد الصحة العامة. وذلك من خلال ما يلي:

- معرفة واقع انتشار مرض اللشمانيا بين الكلاب في محافظة حماة.
- تحديد نوع العترات المنتشرة بين الكلاب من أجل الربط بين الإصابات الكلبية باللشمانيا البشرية.
- تحديد عوامل الخطورة لانتشار اللشمانيا من خلال فحص أهم ثوي خازن لها.

الفصل الثاني

Chapter tow

الد راسة المرجعية

Literature Review

2- الدراسة المرجعية Literature Review:

2-1 تعريف اللشمانيا:

اللشمـانيا: هـي مرض طفيلـي ذو نمط وبـائي لـه مظـاهر سريرية متنوعـة من تقرحـات جلديـة إلـى أمراض حشوية شديدة تهدد حياة المصاب ويعتبر داء اللشمانيا مرض حيواني المنشأ وتكون العدوى البشرية عرضية (Ashford, 1996 ; Dantas-Torres, 2006b)

2-2 تصنيف اللشمانيا: داء اللشمانيا مرض طفيلي المصدر من الأوالي التي تعيش في الدم والأنسجة للإنسان والحيوان الذي ينتمي إلى عائلة Trypanosomatidae ورتبة Kinetoplastide ، هذه العائلة تقسم إلى ستة أجناس منها جنس اللشمانيا Leishmania (داود، 2007) والتصنيف الكامل، للطفيلي حسب (Chappuis *et al.*, 2006)

Kingdom	Protista
Subkingdom	Protozoa
Phylum	Sarcomastigophora
Subphylum	Mastigophora
Class	Zoomastigophora
Order	Kinetoplastida
Suborder	Trypanosomatina
Family	Trypanosomatidae
Genus	Leishmania

أهم أنواع طفيليات اللشمانيا في العالم القديم والحديث:

Old World: Leishmania donovani, Leishmania tropica, Leishmania infantum, Leishmania major, Leishmania aethiopica.

New World: Leishmania chagasi, Leishmania enriettii, Leishmania amazonensis, Leishmania venzuelensis, Leishmania braziliensis.

يحتوي جنس اللشمانيا على ثلاث أنواع تصيب الإنسان هي اللشمانيا المدارية (L. tropica) وهي التي تسبب مرض اللشمانيا الجلدية (حبة حلب) واللشمانيا البرازيلية (L. braziliensis) والتي تسبب مرض اللشمانيا المخاطي الجلدي (داء اللشمانيا الأمريكية) ولشمانيا دونوفانى (L. donovani)والتي تسبب داء اللشمانيا الحشوي. (Pearson *et al*., 2000)

3-2 أشكال طفيلي اللشمانيا:

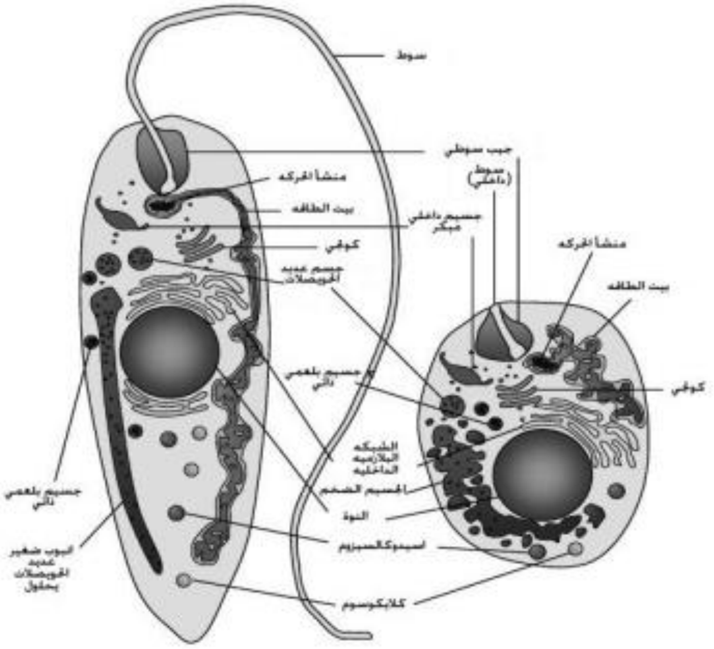
<u>هناك شكلان لأنواع اللشمانيا:</u>

1-الشكل أمامي السوط Promastigote form:

وهو مغزلي الشكل والنواة في وسط الطفيلي والجسم الحركي في قاعدة السوط ويشاهد في إناث ذبابة الرمل العائدة إلى جنس phlebotomus والجنس Lutzomyia (Ritting and Bogdan, 2000)

2-الشكل اللاسوطي Amastgote form:

الموجود في الإنسان والأثوياء الخازنة من الثدييات ويكون مستديرا ويتكاثر بواسطة الانشطار الثنائي البسيط داخل الخلايا البلعمية الكبيرة في الجلد ولأغشية المخاطية والعقد اللمفية ونقي العظم والطحـــــــال.



الصورة(1): أشكال طفيلي اللشمانيا الشكل اللاسوطي والشكل المسوط. (Sience direct)

2-4 أشكال المرض سريريا:

هناك أشكال متعددة لهذا المرض بحسب المظاهر السريرية المختلفة له منها:

2-4-1-داء اللشمانيا الجلدي: وهو أكثر أشكال اللشمانيات شيوعا يسبب آفات جلدية تتمثل بشكل أساسي في التقرحات على الأجزاء الظاهرة من الجسم والتي يمكن أن تسبب ندوبا دائمة وعجز خطير ويشكل حوالي 95% من حالات داء اللشمانيا الجلدي في الأمريكيتين وحوض البحر المتوسط والشرق الأوسط ووسط آسيا ويقدر عدد الحالات الجديدة سنويا بما يتراوح بين 600 ألف إلى مليون حالة على الصعيد العالمي ولكن لا تبلغ المنظمة إلا بحوالي 200 ألف منها

الشكل(2): اللشمانيا الجلدية عند الإنسان. (وزارة الصحة السورية، 2016)

الصورة(3): اللشمانيا الجلدية عند الكلاب. (العبيدي، 2019)

2-4-2-داء اللشمانيا الجلدي المخاطي: ويسبب التلف الجزئي أو الكلي للأغشية المخاطية للأنف والفم والحنجرة ويتركز في أكثر من 90% من حالات داء اللشمانيات المخاطي الجلدي في دولة بوليفيا والبرازيل واثيوبيا والبيرو

الصورة(4): آفة جلدية ناتجة عن الإصابة بداء اللشمانيا الجلدي المخاطي. (WHO, 2012)

2-4-3-داء اللشمانيا الحشوي المعروف أيضا (kala-azar) وهو مرض مميت في 95% من الحالات إذا ترك دون علاج ويتميز بنوبات غير منتظمة من الحمى وفقدان الوزن وتضخم الطحال والكبد وفقر الدم وتتركز معظم حالاته في البرازيل وشرق إفريقيا والهند ويقدر عدد حالاته الجديدة حول العالم بما يتراوح بين 50 ألف و90 ألف حالة سنويا تُبلغ المنظمة بنسبة تتراوح من 25 -45% فقط منها وهو مرض يمكن أن يسبب فاشيات ووفيات

الصورة(5): الأعراض السريرية لداء اللشمانيا الحشوي عند الإنسان. (WHO, 2000)

الصورة(6): اللشمانيا الحشوية عند الكلاب. (Solano *et al.,* 2011).

5-2 انتقال داء اللشمانيا:

يعد انتقال طفيلي اللشمانيا من النواقل الحيوية وأن كل نوع من أنواع اللشمانيا يتكيف لنقلها نوع معين من ذبابة الرمل حيث أن الإناث حصراً مَن تتغذى على الدم وخاصة في الأجواء الرطبة الخالية من الرياح والأمطار حيث تكون نشيطة في أثناء الليل وفترة الفجر وينقل طفيلي اللشمانيا بطريقة غير مباشرة ما بين مضيف ومضيف آخر من خلال ذبابة الرمل من جنسي Lutzomyia, Phlebotomus (Gallego Solano *et al.*, 2009).

يحصل انتقال الطفيلي عن طريق لسعة الحشرة وسحب كمية من الدم وتعتبر هذه المرحلة مهمة جدا في انتقال الطفيلي (Ates *et al.*, 2013).

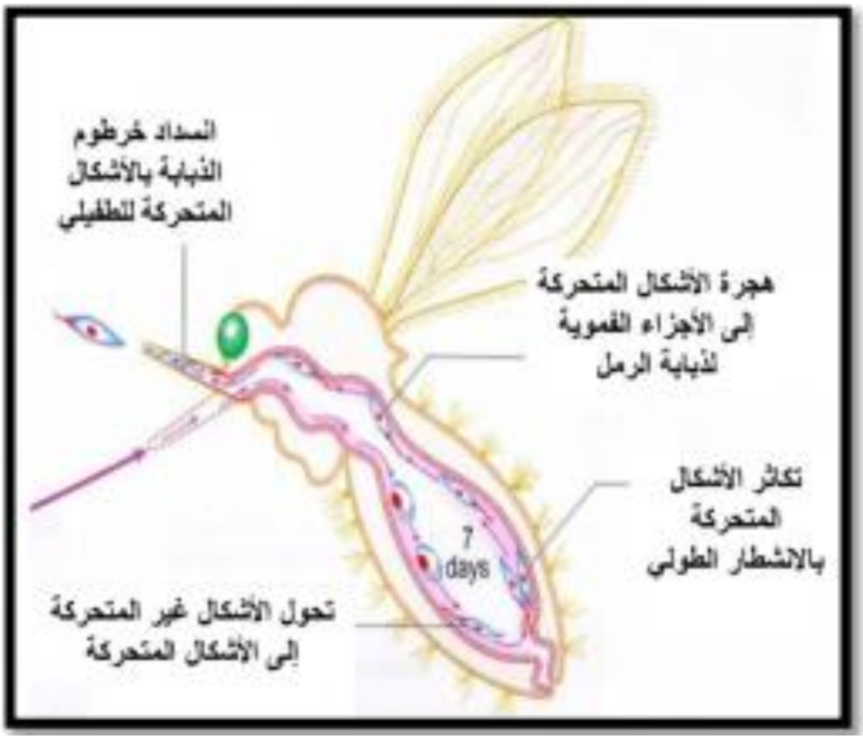
كما يمكن انتقال المرض من الشخص المصاب إلى الشخص السليم المجروح عن طريق التماس ويمكن أيضا أن تحصل الإصابة بالمرض مترافقة مع نقص المناعة المكتسب (الإيدز) وكذلك عن طريق استخدام المحاقن الطبية الملوثة بالطفيلي (Vidyashankar and Agrawal, 2007).

وعند دخول الطفيلي إلى الشخص السليم بعد لدغة أنثى ذبابة الرمل يحدث تفاعل ما بين طفيلي اللشمانيا والخلايا المناعية للمضيف بصورة مباشرة بعد حقن ذبابة الرمل الطفيلي عند سحبها للدم إذ تحصل استجابات التهابية في الأنسجة التي تحيط مكان الحقن واللسع (peters, 2008).

تبدأ عملية دخول الطفيلي إلى داخل الخلية البلعمية عندما تصبح الأشكال أمامية السوط المعدية بتماس مباشر مع غشاء الخلية ينتج عن التماس ترابط يعتمد على نوعين من المحددات البروتينية السطحية هي :

التي تتفاعل مع مستقبلات Lipophsphoglycan (LPG) , Glycoprotein63 (gp63) الخلايا الالتهابية للبلاعم ويتم بعدها دخول الطفيلي إلى الخلية البلعمية.

يمتلك الطفيلي ميكانيكية خاصة ليحمي نفسه من التحلل داخل المضيف الفقاري يمكن تفسيرها بتثبيط الأنزيمات الحالة وانزيمات أخرى موجودة في الأجسام الحالة في الخلية البلعمية، كما أن أنواع طفيلي اللشمانيا تستطيع تجنب الانفجارات التنفسية بسبب وجود أنزيمات مثل speroxide dismutase التي تحميها من تأثير الجذور الأوكسجينية ويجب الإشارة إلى أن هذه الآلية هي صفة مشتركة بين الأجناس (اللشمانيا والتوكسوبلازما والتريبونوزوما) حيث أن هذه الأجناس لها القدرة على إيقاف الانفجارات التنفسية وتثبيط عمل الأنزيمات الحالة التي تنتج متأيضات أوكسيجينة قاتلة لتلك الكائنات (Casadevall and Pirofski, 2009)



الصورة(7): تطور طفيلي اللشمانيا داخل انثى ذبابة الرمل. (Annette., 2011).

6-2 دورة الحياة:

يعد مرض اللشمانيا من ضمن الأمراض الطفيلية الحيوانية المصدر، يصاب بها الإنسان عن طريق لدغ أنثى ذبابة الرمل، وهذه الحشرة صغيرة الحجم، وليس لها صوت عند طيرانها أثناء المساء، على ارتفاع منخفض من سطح الأرض، وتعيش في الجو الحار الرطب، لذلك فان نشاطها يزداد في فصل الصيف، وتتغذى على دم الانسان او الحيوان

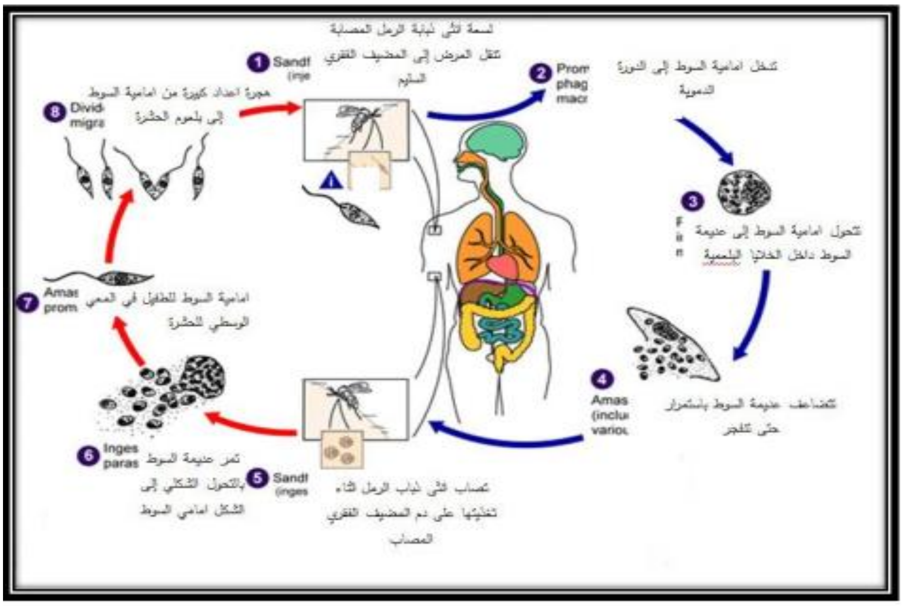
.(Rebollar *et al.*, 2005)

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 فإنها تحقن هذه الطفيليات في جسمه مسببة له المرض. (Salomon *et al.*, 2007)

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

إن ذبابة الرمل تنقل طفيليات مرض اللشمانيا إما من شخص إلى آخر 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. الصورة(8).



الصورة(8): دورة حياة طفيلي اللشمانيا في الثويين الفقاري واللافقاري. (WHO, 2000)

2-7 عوامل الخطر الرئيسية:

2-7-1-الظروف الاجتماعية الاقتصادية: يزيد الفقر من احتمالات الإصابة بداء اللشمانيا وقد يزيد سوء الظروف السكنية والظروف الصحية في المنازل (قصور إدارة النفايات أو الصرف الصحي المفتوح) من مواقع تكاثر ذباب الرمل واستراحتها فضلا عن إمكانية وصولها للبشر وينجذب ذباب الرمل إلى المساكن المزدحمة لأنه من السهل عض الناس والتغذية على دمائهم كما أن السلوك البشري مثل النوم في الخارج أو على الأرض قد يزيد من احتمالات الإصابة بهذا الداء.

2-7-2-سوء التغذية: تزيد النظم الغذائية التي تفتقر إلى البروتين والطاقة والحديد والفيتامين (A) والزنك من احتمالات تطور العدوى إلى مرحلة المرض المتقدم.

2-7-3-تنقل السكان: غالبا ما تحدث أوبئة داء اللشمانيات عندما ينتقل عدد كبير من الأشخاص ضعيفي المناعة إلى مناطق جديدة تشهد انتقالا مكثفا للمرض.

2-7-4-التغيرات البيئية والمناخية: قد يتأثر معدل الإصابة بداء اللشمانيا بالتغيرات في التحول الحضري أو إزالة الغابات والتوغل البشري في المناطق الحراجية ويؤثر تغير المناخ على انتشار داء اللشمانيات من خلال التغيرات في درجات الحرارة وهطول الأمطار مما يؤثر على أعداد ذباب الرمل وتوزيعها الجغرافي كما يتسبب الجفاف والمجاعة والفيضانات في هجرة الناس إلى مناطق تشهد انتقالا مكثفا للطفيلي (who, 2023)

2-8 إمراضية داء اللشمانيا Pathogenesis of Leishmaniasis:

داء اللشمانيا الجلدي (CL) واحد من العوامل المسببة للأمراض حيوانية المنشأ الهامة في الانسان والتي يمكن أن تسبب التهابات خطيرة وتهدد الحياة، وكذلك الحال مع الأثوياء العرضية وغيرها من الحيوانات (وخاصة القوارض والكلاب) وكما هو الحال في معظم الامراض الطفيلية فان مواجهة الإنسان لهذه الأمراض يعتمد على التفاعلات المعقدة بين الاستجابات المناعية للمضيف وعوامل الفوعة من أنواع اللشمانيا Ridley,2004)

ومن أهم عوامل الضراوة في اللشمانيا:

2-8-1- أنزيمات 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. إن مصدر هذه الانزيمات هو جهاز كولجي ، وقد تتواجد في الشبكة الإندوبلازمية ، المستلمات السوطية وعلى اسطح الأغشية الخارجية (Doyle and Dwyer, 2005) .

الـ APEيلعب دور مهم في وقف تخليق منتجات المؤكسدات O_2, H_2O_2 من قبل الخلايا البلعمية، ايضا له وظائف عملية مهمة في حركة ووظيفة الطفيلي وحماية الطفيلي تحت الظروف البيئية غير الملائمة، إن الضراوة في طور Amastigots للـ APE تكون أكثر بمرتين مما هو في طور Promastigot وهناك نوع اخر من ال APE يسمى خارج خلوي ولكن عمله غير واضح (Soares *et al.*, 2008).

2-8-2- أنزيم Proteas:

يوجد هذا الانزيم في الطور غير المسوط Amastigots في تركيب يسمى megasomes ونشاط هذا الإنزيم يرتبط مع البروتين سكري رئيسي في السطح (KD-Gp63) الmetalloprotease المعتمدة على وجود الزنك و lipophosphoglycan لكلا الطورين Promastigot الخارج خلوي و Amastigots الداخل خلوي (Bates and Rogers, 2007).

يعد أنزيم Proteas مهم جدا في ضراوة داء اللشمانيا عند درجة الحموضة المثلى ph (ويسمى أيضا الانزيم الممرض للشمانيا او انزيم الحماية) اذ أن وظائفه حماية الطفيلي فعندما تبتلعه خلية البلعم الكبير macrophage بنجاح، يحدث ان الأمونيا NH_4 واليوريا تغيران درجة الحموضة PH للأجسام الحالة phagolysosomes ولبروتينات التحللhydrolyze lysosomal protein ومن جهة أخرى فإنه مهم في ربط طفيلي اللشمانيا مع مستقبلات المتمم للبالعات CR3,CR1 إن طور Amastigots ذو فعالية عالية لل Protease مما طور Promastigot لذلك يعزى دور الضراوة في الكائن (Klein, 2004; Chaudhuri and Chang,1988; Huber *et al.*, 1998)

2-8-3- المركب لايبو فوسفو كليكان Lipophosphoglycan coat (Lpg):

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

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

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

2-9-وبائية داء اللشمانيا:

هناك نوعين من المصطلحات التي تستخدم في منظمة الصحة العالمية لهذا الداء هما داء اللشمانيا الجلدي في العالم القديم وداء اللشمانيا الجلدي في العالم الحديث (WHO, 2011)

تتراوح فترة الحضانة في مختلف أنواع داء اللشمانيا من عدة أيام حتى عدة سنوات ولكن عادة ما تكون في حدود عدة أسابيع إلى 6 أشهر في داء اللشمانيا الجلدي تظهر الأفات الجلدية الأولية عادة بعد عدة أسابيع من دخول الطفيلي وإصابته للأوعية حيث فترة الحضانة بمعدل 2-6 أشهر (Faulde *et al.*, 2008)

تعد الكلاب مستودع رئيسي لإصابة الإنسان بداء اللشمانيا بينما في مناطق أخرى يعد الإنسان الخازن الرئيسي للمرض ويساعد في زيادة انتشاره. وهكذا يعتبر الإنسان وبعض الحيوانات القريبة منه المضيف العرضي لكثير من أنواع اللشمانيا والتي تحتفظ بدورات بين الحيوانات البرية وذباب الرمل L. ssp ،L. tropica ،L. infantum وبقية الأنواع ممكن أن تحفظ في الكلاب والقطط والقوارض تزيد من مخاطر الانتقال إلى الإنسان والحيوانات السائدة الأخرى ممكن أن تشترك كمضيف ثانوي عند الإصابة بـ:

L. donovani, L. major, L. exicana, L. guyaensis, L. chagasi, L. tropica and L. peruviana.

وتتكيف للإنسان ولكن أحيانا ممكن أن تصاب الحيوانات (Elamin *et al.*, 2005; Kerr *et al.*, 2008)

إن 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)

إن ذباب الرمل من جنس Phlebotomus العالم القديم و Lutzomyia العالم الجديد هي النواقل الرئيسية المسؤولة عن نقل المرض حاليا هذه هي الناقلات المعروفة الوحيدة القادرة على الانتشار والبراغيث والقراد لم تظهر كناقلات مختصة ومع ذلك فقد تم رصد حالات نادرة من داء اللشمانيا من خلال تبادل الدم أو سوائل الجسم والمخالطة المباشرة وحالة واحدة على الأقل من الانتقال الجنيني والمحاقن بين متعاطي المخدرات عن طريق الحقن الوريدي ووبائية داء اللشمانيا تعتمد على خصائص الأنواع الطفيلية والخصائص البيئية لمواقع الانتقال والتعرض السابق والحالي من مجتمع

الإنسان للطفيلي وعمر المضيف والتثبيط المناعي والموسم ونوع هيكل المبنى أو المنزل والتوزيع الجغرافي والتفاوت الواسع للسلوك البشري (De Lima *et al.*, 2008)

ووفقا لمنظمة الصحة العالمية (Who, 2011) فإن المرض متوطن في 88 بلد من شمال الأرجنتين إلى جنوب ووسط الولايات المتحدة وجنوب أوروبا وآسيا (عدا الجنوب الشرقي) والشرق الأوسط وافريقيا (خاصة في وسط وشمال) وليس في استراليا وأكثر من 90% من الحالات لجميع أنحاء العالم تحدث في بنغلادش وشمال شرق الهند والنيبال والسودان (العالم القديم) وشمال شرق البرازيل (العالم الجديد) (Caceres *et al.*, 2007)

خمسة على الأقل من الأنواع تسبب داء اللشمانيا الجلدي في العالم القديم:

L. donovani, L. infantum, L.tropica, L. aethiopica, L. major

وأكثر الإصابات كانت من نوع L. major, L.tropica أما L. donovani تسبب المرض الحشوي ا(kala-azar) تسببت بالمرض الحشوي بين الجنود الأمريكين الذين يخدمون في شبه الجزيرة العربية و L.tropica داء اللشمانيا الجلدي (Shiraz and Syed, 2007).

تأخذ الحالات حول العالم منحى يتجه للارتفاع بسبب وجود البؤر المستوطنة الجديدة مضافة للبؤر القديمة حيث لم يتم التحكم في الأوبئة مما أدى لتوسع المناطق الموبوءة بسبب التحولات في التنمية والسكان ويساهم فيروس نقص المناعة المكتسب المرافق للشمانيا في الدول الغربية حيث أصبحت العدوى تهدد وبشكل خطير في جنوب غرب أوروبا 9% من مرضى نقص المناعة المكتسب. (Rosenthal *et al.*, 2003)

منذ عام 1993 فالمناطق التي تتوطن فيها اللشمانيا توسعت بشكل كبير مع زيادة في عدد الحالات المسجلة بسبب الانتشار الجغرافي ويرجع ذلك إلى عوامل تتعلق في التنمية والمشاريع الضخمة

والهجرة من الريف للمدينة بالإضافة للمشاريع من صنع الإنسان مع الأثار البيئية مثل شبكات الري والآبار وإزالة الغابات التي تسهم في انتشار داء اللشمانيا (Van Thiel, 2010).

في الجمهورية العربية السورية وجد بان L. tropica التي تسبب ACLلا يزال متوطناً في حلب وكذلك في إدلب، اللاذقية، وحماة ومدينة دمشق. ان الـ ACLتمثل ٪ 90من جميع حالات CL ناقلاته هي P. sergentiوليس هناك دليل على وجود مضيف خازن غير بشري. الـ ZCL بسبب L.majorتحدث في المناطق الريفية بالقرب من دمشق، دير – الزور والحسكة، وناقلاته هي P.papatasiوالمضيف الخازن هي القوارض، وحالات الـ ZCL يمثل ٪ 10من الحالات CL والعدد السنوي ل حالات CL المسجلة أكثر من 20000 (WHO, 2008).

تنتشر أكثر من 90% من حالات اللشمانيا الجلدية في أفغانستان، وإيران، والسعودية، وسورية. وتنتشر اللشمانيا الجلدية في سورية مع وجود حالات قليلة من اللشمانيا الحشوية في درعا والسويداء . تقسم اللشمانيا الجلدية وبائيا في سورية إلى نوعين: نوع ناجم عن اللشمانيا الكبرى، حيث تنتشر في عدة مناطق من سورية هي الضمير، والناصرية، والرحيبة، وشرق قاسيون، ودير الزور، والحسكة، و الرقة (Klaus SN *et al.,* 1999, Postigo, 2010).

بينما تنتشر اللشمانيا المدارية الصغرى في طرطوس، وحلب، وحماه، وادلب، وغرب قاسيون، واللاذقية. ويترافق انتشار اللشمانيا في سورية مع مناطق انتشار الفواصد (Marouf, 2006) ويعود انتشار اللشمانيا المدارية في المناطق السابقة للفاصدة البابتاسية والسرجنتية. ويعد الانسان خازنا أساسيا لها بينما تلعب الحيوانات الأخرى دور خوازن ثانوية. أما اللشمانيا الكبرى فتنتشر في منطقتها الفاصدة البابتاسية ويلعب الإنسان دور خازن ثانوي، بينما يلعب دور الخازن الأساسي جرذ بساموميس.

تلعب البيئة دورا هاما في انتشار النوعين، حيث تلعب دورا في الحفاظ على الخازن من خلال توفير الغذاء الملائم له، حيث يتغذى الجرذ على عشبة الشنان وينتشر في المناطق التي تتوفر فيها. وغالباً ما تكون مناطق انتشار المرض هي مناطق مخالفات سكنية تفتقر إلى الخدمات العامة، مما يوفر البيئة الملائمة لتكاثر الحشرة الناقلة.

أما بالنسبة لداء اللشمانيات الحشوي في سورية، فلقد شخصت إصابتان بداء اللشمانيات الحشوي في منطقة كسب عام 1058م، كما عزلت طفيليات اللشمانيا الطفيلية من الكلاب في المنطقة نفسها. وشخصت في السنوات الأخيرة إصابات جديدة بداء اللشمانيات الحشوي في محافظات إدلب، وحلب، واللاذقية، وطرطوس، ودرعا(Marouf 2006, Tayeh *et al.,* 1997) .

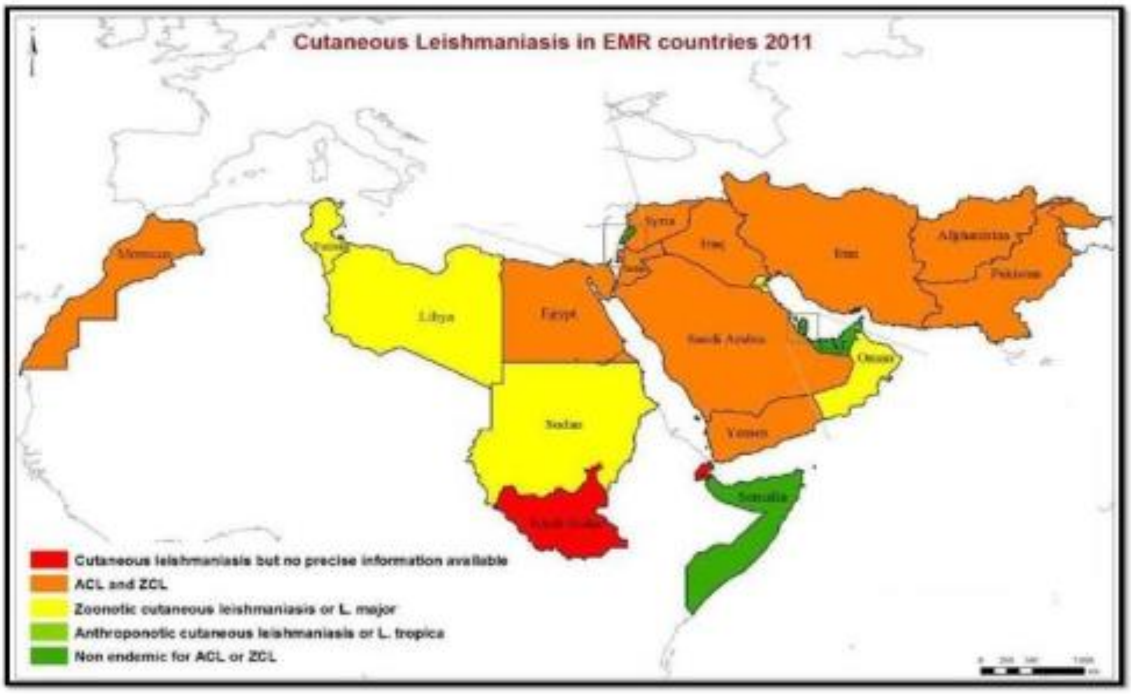
في الأردن هنالك 300حالة سنويا، يحدث ACL في منطقة الحدود الشمالية، حيث يتواجد في قرى ريفية على افتراض وجود أثوياء خازنة غير البشرية، اما الـ ZCLفينتشر على نطاق واسع في وادي الأردن بشكل خاص في منطقة سويمة على البحر الميت. (WHO, 2008)

داء اللشمانيا الجلدي في إيران Anthroponotic Cutaneous Leishmaniasis (ACL) الذي تسببه L. tropica ينتشر 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 Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis (ZCL) التي تسببها L. major انتشر على نطاق واسع في الوسط والجنوب و الشمال و الشمال الشرقي، وارتفعت عدد الحالات الـCL المسجلة من 25729 في عام 2008 إلى 44792 في عام 2009. (Davami *et al.*, 2010)

في المملكة العربية السعودية تنتشر الـ L. tropicaفي الجزء الجنوبي الغربي من البلاد، وناقلاتها هي P. sergenti في حين ZCL التي تسببها L. major يحدث بشكل رئيسي في المركز وشرق

البلاد. ناقلاته هيP. papatasi وقد انخفض العدد السنوي الى النصف من 4000 حالة منذ أوائل 1980 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 والعراق منذ حرب الخليج في عام1990 بما في ذلك داء اللشمانيا الحشوي (WHO, 2008; Ojha, 2007).

في العراق داء اللشمانيا متوطن في جنوب البلاد بشكل رئيسي مع حالات لا يمكن الاستهانة بعددها في المناطق الشمالية بلغت تقريبا 2000 حالة سنوية (AL–Aubaidi, 2007).



الصورة(9): التوزيع الوبائي لداء اللشمانيا الجلدية في إقليم شرق المتوسط والوطن العربي.

(WHO, 2012)

2-10-التشخيص المخبري لداء اللشمانيات:

أ- اللشمانيا الجلدية:

يمكن أن يخطئ الأطباء غير المعتادين على رؤية حالات الإصابة بداء اللشمانيات الجلدي في تشخيص الآفة، حيث يمكن أن يعتبرونها كعدوى بكتيرية عادية خاصة بعد عزل بكتيريا العنقودية الذهبية من عينات الجلد التي يتم أخذها لإجراء فحص بكتيري. ويشكل وجود آفات جلدية في المناطق المكشوفة من الجسم مضى عليها عدة أشهر دليلا على إصابة جلدية تعود للشمانيا الجلدية (Harris *et al.*, 1998).

يشكل تشخيص داء اللشمانيات الجلدي تحديا للأطباء ويعود ذلك للتنوع الكبير للأعراض السريرية التي يسببها، والاختلاف في شدة الآفات الجلدية وعمرها في جسم المريض، وتنوع طفيليات اللشمانيا المسببة لداء اللشمانيات الجلدي، والخلط بين تشخيص هذا الداء والأمراض الجلدية المختلفة المشابهة مثل داء السل الجلدي، وداء الجذام، وداء الشعريات المبوغة، وداء الفطار الكرواني، والأورام الخبيثة

(Chulay, 1991; Kaneria *et al.,* 2005; Reithinger *et al.*, 2007)

تعد القصة السريرية للمريض، ومكان الإقامة، أو السفر إلى مناطق موبوءة بهذا المرض، ووضع المنطقة التي يقطنها، دلالات تشير إلى احتمالية الإصابة بهذا الداء. يؤدي التشابه الكبير بين الأعراض السريرية لداء اللشمانيات الجلدي وغيره من الأمراض الجلدية الأخرى إلى إمكانية أن يخطئ المختصون في تشخيصها، الأمر الذي يتطلب اللجوء إلى طرق مخبرية للتشخيص، بالإضافة إلى الأعراض السريرية، تسمح بكشف الطفيلي وتحديد نوع اللشمانيا المسببة بشكل دقيق (Tojal da silva *et al.,* 2006)

ب- اللشمانيا الحشوية:

إن التشخيص الدقيق لطفيلي اللشمانيا يعتبر من أحد المشاكل التي تواجه الباحثين وذلك بسبب كثرة الأعراض المرضية التي تلاحظ على الحيوان لذلك تعتبر الاختبارات التشخيصية الملائمة وبوقت مبكر حاجة ضرورية وماسة في تشخيص اللشمانيا الحشوية وذلك عند حصول المرض سواء مع أعراض ظاهرة او حتى غير ظاهرة على الحيوان (ehab ke *et al.*, 2014)

ويتم تشخيص الصورة الحشوي تقليديا من خلال إظهار الخلايا الليشمانية للطفيلي في السائل المسحوب من نخاع العظم او الطحال ونادرا من العقد الليمفاوية أو الكبد ومعدلات إظهار الطفيلي وعزله ضعيفة إلى حد ما من الآفات الجلدية والمخاطية الجلدية بسبب انخفاض الحمولة الطفيلية وقد تم مؤخرا تطوير العدد من البروتينات المعاد تركيبها لتحقيق التشخيص الدقيق وثبت أن المستضد المستخدم في أشكال الاختبار المختلفة حساس للغاية ومحدد لمرض اللشمانيا الحشوي وهو مفيد في تشخيص الإصابة المشتركة بفيروس نقص المناعة المكتسب البشرية واللشمانيا كعلامة تشخيصية وتم الإبلاغ عن تقنيات جزيئية تستهدف جينات مختلفة من الطفيلي حيث تعد تقنية تفاعل البوليمراز المتسلسل هي التقنية الأكثر شيوعا والتي يتم استخدامها بنجاح في تمييز وتشخيص أنواع اللشمانيا (singh, 2003)

<u>الطرق المخبرية لتشخيص داء اللشمانيات:</u>

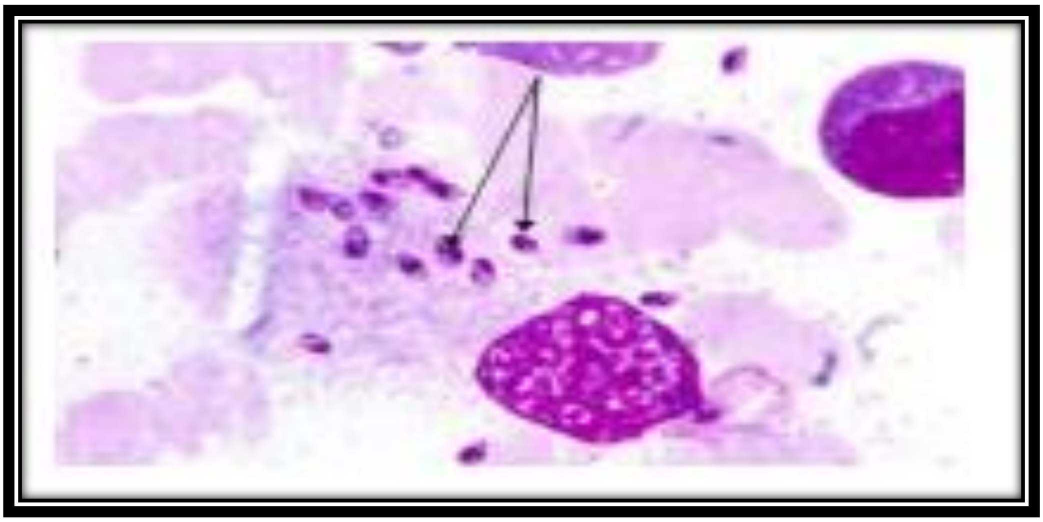
تسمح هذه الطرق بتأكيد وجود الطفيلي في العينات المعزولة من الآفات الجلدية. تصنف هذه الطرق ضمن ثلاث مجموعات: الطرق التقليدية للتشخيص، الطرق المصلية للتشخيص، الطرق الجزيئية للتشخيص. تختلف هذه الطرق من حيث الحساسية، والنوعية، ومدة الإنجاز، والفائدة العملية التي تقدمها الطريقة للطبيب والمريض في آن واحد (Kalter,1994).

2-11-الطرق التقليدية لتشخيص اللشمانيا:

2-11-1 الفحص المجهري:

وهي طريقة سهلة وبسيطة ورخيصة وسريعة تعتمد على تحضير فلم رقيق من العينة المأخوذة من الآفة وتلوينه لكنها تعاني من حساسيتها المنخفضة التي تتراوح بين 50-85%عند فحص عينة واحدة فقط. تسمح هذه الطريقة برؤية الليشمانات في الرشاحات الجلدية. لا تحدد هذه الطريقة نوع طفيلي اللشمانيا، ويجب الانتباه عند استخدامها إلى تشخيص العينات المأخوذة من الإصابات القديمة، حيث ينخفض عدد الطفيليات فيها. وبالتالي تنخفض حساسية هذا الاختبار في تشخيص الآفات القديمة التي يزيد عمرها على ستة أشهر. في حالة وجود عدة آفات يتم اختيار الآفة الأكبر والأكثر رطوبة (Kalter, 1994).

يجرى تلوين الفيلم باستخدام ملون غيمزا أو ملون H&E (hematoxyline-eosine)حيث تتلون النواة بالأزرق ومنشأ الحركة بلون قرنفلي وتأخذ الكريات الحمراء لونا برتقاليا. ويستخدم ملون Romnowsky الذي يؤدي إلى تلون النواة بلون أرجواني إلى قرنفلي .(Singh, 2006)



الصورة(10): شكل طفيلي اللشمانيا بعد التلوين بصبغة غيمزا. (Singh, 2006)

يعد ملون غيمزا الملون الأكثر استخداما حيث يلون اللشمانيا في العينات المأخوذة، ويستخدم بدرجة pH=7.2 بدلا من pH=6.8 المستخدمة في الدمويات. تلون اللطاخات المحضرة من العينات الجلدية بالملون وبعدها تثبت بالميثانول لمدة خمس دقائق فتتلون النواة ومنشأ الحركة بلون أزرق قرنفلي إلى أرجواني مع هيولى زرقاء شاحبة. ويكون منشأ الحركة أصغر وأشد كثافة من النواة ويظهر بشكل عصية مستديرة (Navin *et al.*, 1990)يسمح الفحص المباشر برؤية الليشمانات التي تمتاز بشكلها الدائري أو البيضوي، حيث يتراوح قطرها بين (2-4) ميكرون. ويمكن الاكتفاء بفحص لطاخة واحدة ولكن فحص ثلاث إلى خمس لطاخات يزيد من حساسية الاختبار. تعتمد الطريقة الأفضل لتحضير اللطاخة على تنظيف الآفة الجلدية بالكحول ونزع البقايا الجلدية المتقرحة أولا.

لا يفضل استخدام اليود في تنظيف الآفة لأنه يمكن أن يمنع نمو الطفيليات في المستنبت، بينما يسمح الكحول بخفض تلوث المستنبت الذي يشكل مشكلة كبيرة عند استخدام هذه الطريقة. ثم نقوم بعد التنظيف بحقن 0.1 مصل فيزيولوجي عقيم ضمن الآفة بواسطة إبرة تدخل من خلال الجلد السليم إلى حافة الآفة تحرك الابرة تحت الجلد بشكل متكرر إلى الأمام والخلف وبنفس الوقت يسحب السائل. تعد رؤية الطفيلي أساس التشخيص في الفحص المجهري. يمكن رؤية الليشمانات بتكبير 100Xوبوجود زيت الأرز، إما داخل البلاعم أو خارجها ولا يمكن الجزم بوجود الطفيلي مالم يتم رؤية النواة ومنشأ الحركة

2-11-2 زرع الطفيلي:

يستخدم الزرع لتشخيص حالات اللشمانيا الناكسة، أو الآفات القديمة أو إصابات الأغشية المخاطية والجلدية الناجمة عن طفيليات اللشمانيا البرازيلية، وعزل الطفيليات التي لا نستطيع كشفها بتقنية الفحص المجهري. يجري الزرع على أوساط سائلة أو ثنائية الطور أو أوساط صلبة وحيدة الطور.

وعلى الرغم من كون الزرع هو أفضل طريقة لتشخيص اللشمانيا بسبب النوعية العالية إلا أن المشكلة في انخفاض الحساسية لا تزال مستمرة. تزداد حساسية الزرع عند إجراء خمس زرعات للآفة نفسها وتزداد الإيجابية كلما كان عدد الطفيليات في العينة المختبرة مجهريا أكبر (Kalter, 1994)

يختلف نمو الأنواع المختلفة لطفيليات اللشمانيا وسرعته على أوساط الزرع، حيث يكون بعضها صعب النمو وبالتالي يحتاج إلى أوساط أغنى، مثل اللشمانيا البرازيلية التي يكون نموها أصعب من نمو اللشمانيا المكسيكية. تشمل العينات المزروعة المادة المأخوذة بالمشرط لعمل اللطاخة أو الخزعات الجلدية، أو خزعات الكبد، أو العينات المأخوذة من نقي العظم .يمر نمو الطفيلي أثناء الزرع بأربعة أطوار تبدأ بطور الكمون الذي يستمر خلال اليومين الأول والثاني بعد الزرع، يليه الطور اللوغاريتمي الذي يمتد من اليوم الثالث حتى اليوم الخامس. ومن ثم يبدأ طور الاستتباب بدء" من اليوم السادس حتى الثامن الذي يستقر فيه التكاثر ويصل خلاله عدد الطفيليات إلى حده الأعظمي، ثم يبدأ بعدها طور الهبوط والانحلال من اليوم التاسع ويستمر حتى نهاية الزرع (University of Glasgow, 2008)

يمكن استخدام عدة أنواع من المستنبتات للزرع وهي تشمل: وسط، NNN وسط شنايدر، وسط Sloopy Evans.، وسط RPMI 1640، وسط Weber.

2-11-3 طرق التشخيص المناعي المصلية:

2-11-3-1 الطرق التقليدية:

تمتاز الطرق التقليدية بانخفاض نوعيتها وحساسيتها، حيث لا تسمح بالتمييز بين الإصابة باللشمانيا والإصابة بالمثقبيات ولها تفاعلات متصالبة مع الملاريا وداء المقوسات وداء الاميبيا. وتعتمد هذه الطرق على مقايسة عيار الأضداد في مصل المريض أو المستضدات .تعطي هذه الطرق نتائج سلبية عند تشخيص اللشمانيا الجلدية لانخفاض عيار الأضداد في المصل بسبب موضعية المرض

لذا لا تستخدم. وينبغي اللجوء إلى تفاعل الـ PCR لتشخيص داء اللشمانيات الجلدية وداء اللشمانيات الجلدي المخاطي. تم بنجاح استخدام الأشكال المتحركة واللشمانيات كمستضدات نوعية في اختبار الإليزا و IFAT لتشخيص اللشمانيا الحشوية (Schallig and Oskam, 2002)

تم اختبار العديد من البروتينات الطفيلية المؤشبة كمستضدات في اختبار الاليزا والتراص المباشر، حيث أظهر المستضد المأشوب K39 أفضل النتائج، محققا حساسية من 100-64% ولم يظهر هذا المستضد تفاعلات متصالبة مع أنواع المثقبيات الأخرى لذا كانت النوعية 100%.هذا ويلاحظ انخفاض حساسية الاختبار الأخير بالمقارنة مع الاختبارات التي تستخدم الطفيلي بشكل كامل، لكن انخفاض كلفة الإنتاج يشكل ميزة إضافية لصالح هذا الاختبار

2-3-11-2 أضداد وحيدة النسيلة:

تمتاز هذه الطريقة بحساسيتها العالية ونوعيتها الكبيرة عند مقارنتها بالطرق التشخيصية التقليدية . وتستخدم هذه الطريقة لتشخيص مستضدات اللشمانيا الطفيلي في العينات او الخزعات النسيجية (Gradoni and Gramiccia, 2008).

يجري تحضير هذه الأضداد بحقن فئران BAIC/C بمستحضرات بروتينية مكونة من مستضدات محضرة من أغشية المشيقات المزروعة أو الليشمانات. ومن ثم جمع الأضداد وحيدة النسيلة MAB المتشكلة في مصل الفئران. وتمتاز الأضداد MAB بأنها تتعرف على منطقة مستضدية سائدة مشتركة لكل من الأشكال المتحركة والليشمانات .يتم تطبيق هذه الأضداد بتثبيت الخزعة على صفيحة زجاجية وتركها لتجف بالهواء، ثم إضافة الأضداد وحيدة النسيلة. يتم الكشف عن ارتباط هذه الأضداد مع مستضداتها باستخدام تفاعل لوني عند استخدام أضداد موسومة بالبيروكسيداز، أو باستخدام أحد الأجهزة التي تقيس التألق عند استخدام أضداد متألقة، أو باستخدام أحد أجهزة قياس

الإشعاع عند استخدام أضداد موسومة بمادة مشعة وينحصر استخدام الأضدادالأخيرة في مراكز الأبحاث (Kalter, 1994)

الطرق الجزيئية المستخدمة في تشخيص داء اللشمانيات الجلدي تكشف عن الحموض النووية للطفيلي في مختلف العينات.

2-11-4 الطرق المعتمدة على استخدام مسابير الدنا DNA probes

تمتاز هذه الطرق بارتفاع حساسيتها ونوعيتها، وتعطي النتائج بسرعة مقارنة مع الزرع، وتطبق على العينات مباشرة دون الحاجة إلى عزل الطفيلي بواسطة الزرع. وتعتمد هذه الطرق على استخدام أجزاء من سلاسل مفردة من الدنا النووي، أو دنا منشأ الحركة، لسلالات مرجعية للأنواع المختلفة من اللشمانيا تسمى مسابير. تستخدم هذه المسابير لتهجين سلاسل الدنا المتممة المعزولة من عينات اللشمانيا المجهولة، يلتحم المسبار مع السلاسل المتممة له فيتشكل شريط دنا مضاعف يمكن الكشف عنه بواسطة مقياس التألق عندما يكون المسبار موسوما بمادة متألقة، Florophore أو بوسمه بواسطة ناشبة والكشف عنه بواسطة تفاعل إنزيمي مناعي وتمتاز هذه الطريقة بحساسيتها الكبيرة حيث تسمح بكشف أعداد من الطفيليات تتراوح بين 100-1000 طفيلي ملطخ على فلاتر نايلون (Kalter, 1994) .

الطرق المعتمدة على استخدام تفاعل البولميراز المتسلسل PCR:

يشكل تفاعل الـ PCR تقنية حيوية جزيئية حساسة ونوعية جدا، ويسمح إجراء بعض التعديلات عليها بجعلها متعددة الأنواع ومتعددة التطبيقات. يتم استخدام كل من الدنا النووي ودنا منشأ الحركة كأهداف في هذه الطرق. وتتميز هذه الطرق بارتفاع حساسيتها ونوعيتها، وقدرتها على تحديد العامل

المسبب للإصابة ونوعه، وامكانية تطبيقها على العينات مباشرة دون اللجوء إلى عزل الطفيليات بالزرع، وسرعة تطبيقها، حيث نحصل على النتيجة خلال عدة ساعات (Schallig and Oskam, 2002).

<u>ميزات استخدام تفاعل البولميراز المتسلسل في تشخيص داء اللشمانيات الجلدي:</u>

تمتاز هذه الطرق بدرجة عالية من الحساسية والنوعية، حساسيتها أعلى من حساسية الفحص المجهري والزرع خاصة في العينات التي ينخفض فيها عدد الطفيليات، كما في داء اللشمانيات الجلدي المخاطي.

تسمح هذه الطرق بتحديد كمية الطفيليات في النسج من خلال تحديد كمية الدنا. تدل زيادة كمية الدنا على تطور المرض وزيادة تكاثر الطفيلي، بينما يدل ثبات الدنا أو نقصانه على تراجع المرض، وبالتالي تستخدم هذه الطرق لمراقبة تطور المرض ومدى فعالية العلاج بمضادات اللشمانيا (Reithinger and dujardin, 2007)

يسمح استخدام التضخيم للدنا بتحديد نوع اللشمانيا، مما يكسب هذه الطرق أهمية كبيرة عند التدبير السريري لمرضى اللشمانيا. حيث توجد علاقة بين الإصابة ببعض أنواع اللشمانيا من جهة، وشدة المرض من جهة أخرى، وفعالية المعالجة من جهة ثالثة

يمكن استخدام ال PCR لتحديد السمات النوعية للطفيلي مثل الفوعة ومقاومة الأدوية، وبالتالي يسمح تحديد المعالجة الأكثر فعالية أو حتى تحديد المرضى الأكثر عرضة لخطورة تطور Major complex Lieshmania (MCl) (Reithinger and dujardin, 2007)

يمكن استخدام الـ PCR في الدراسات الوبائية أو دراسة مقاومة الطفيلي للدواء، من خلال قدرتها على اقتفاء أثر الطفيلي، وقدرتها التمييزية العالية بين الأنواع.

يتطلب تطبيق تفاعلات PCR في المجالات السابقة توفر واسمات marker مورثية مناسبة لكشف الطفيلي وتشخيصه، وتحديد كميته في العينة. ويتم ذلك من خلال اختيار هدف من الدنا مكرر في نسخ كثيرة، مثل جينات الاكسونات الصغيرة أو الحلقات الصغيرة، في دنا منشأ الحركة أو جينات الرنا الريباسي.

في حين يشكل الفحص المجهري الخيار الأول للكشف عن الطفيليات في المناطق التي ينتشر فيها الطفيلي. ويتطلب تحديد النوع واجراء الدراسات الوبائية الاعتماد على الطرق الجزيئية التي تعتمد على الدنا. ونظرا" لكون الطرق الجزيئية تحتاج لتكلفة عالية وخبرة وتقنيات عالية، فينبغي العمل على جعل استخدامها أكثر سهولة وخصوصا في المناطق الموبوءة.

بشكل عام يؤدي تفاعل PCRدورين مهمين في البيولوجيا الجزيئية، فهو يسمح أولا" بزيادة كمية المادة الجينية وبالتالي إمكانية تحليلها بتقانات جزيئية أخرى مثل تحديد تسلسل الدنا و RFLP لتحديد الأنواع والسلالات التابعة لطفيلي من الطفيليات طرق التنميط (Reithinger and dujardin, 2007)

2-11-5-1 الطريقة المرجعية المعتمدة على تحليل نمط رحلان أنزيمات اللشمانيا

لم تدخل هذه الطريقة مجال التشخيص الروتيني واقتصر تطبيقها على مخابر الأبحاث فقط لأنها تحتاج إلى خبرة تقنية عالية. لهذه الطريقة العديد من المساوئ فهي تتطلب كمية كبيرة من العينة المزروعة وهنالك صعوبة في الزرع وتكثير بعض الأنواع في أوساط الزرع مثل اللشمانيا البرازيلية. كما تتطلب هذه الطريقة خطوات عديدة تبدأ بزرع الطفيلي لعزله، ثم جمع المشيقات من المزارع، والتثفيل، ومن ثم حلها لتحضير خلاصة الطفيليات التي ستمرر بدورها على أسيتات السلولوز أو هلامة النشاء، ومن ثم تمييز العصابات الإنزيمية بواسطة البيروكسيداز. ويبين الجدول 2الإنزيمات

المستخدمة لتنميط اللشمانيا.

تعتمد هذه الطريقة على كون البروتينات المختلفة تمتلك قابلية حركة مختلفة بالرحلان الكهربائي. ويتم تطبيق تقنية الرحلان الكهربائي للنظائر الإنزيمية لخزين طفيليات اللشمانيا المطلوب تحديد نوعها على هلامة النشاء، أو على أسيتات السلولوز، ومن ثم تطبيق تيار منخفض الشدة مما يتطلب زمن ترحيل طويل. نقارن نمط هجرة إنزيمات العينة المطلوب فحصها مع نمط هجرة إنزيمات السلالات المرجعية لتحديد سلالات طفيليات اللشمانيا، حيث تمتلك كل سلالة نمطا "مميزا" لرحلان إنزيماتها (Schuster and Sullivan, 2002) تنتمي السلالات التي تمتلك النمط الإنزيمي نفسه إلى الوحدة التصنيفية نفسها Zymodeme. وهو يشير إلى مجموعة من طفيليات اللشمانيا التي تمتلك إنزيماتها نمط الرحلان ذاته. وجرت دراسة حركية 15إنزيما" معروفا على الأقل، عند تنميط طفيليات اللشمانيا، ويبين الجدول أهم هذه الإنزيمات (Tashakori M *et al.,* 2003)

أهم الإنزيمات المستخدمة في تنميط الأنواع المختلفة من طفيليات اللشمانيا باستخدام طريقة الرحلان الكهربائي للنظائر الإنزيمية: إيزو سترات ديهيدروجيناز ICD، مالات ديهيدروجيناز MDH، فسفو غلوكو موتاز PGM، إنزيم الماليك ME، نوكليوزيد هيدرولاز اينوزين NHI، سوبر أكسيد ديسموتاز SOD، غلوتامات ديهيدروجيناز GLUD، 6 فسفو غلوكونات ديهيدروجيناز PGD6، ديافوراز DIA، غلوكوز 6 فسفات ديهيدروجيناز G6PD، مانوز فسفات ايزو ميراز MPI، غلوكوز فسفات ايزو ميراز GPI.

2-11-5-2 الطرق الجزيئية لتنميط طفيليات اللشمانيا:

هي الطرق الأكثر استخداما لأنها لا تحتاج إلى جهد كبير. وتستطيع هذه الطرق تمييز الأنواع المختلفة لطفيليات اللشمانيا. وتشمل طريقة تهجين ساوثرن Southern blotting والطرق التي تعتمد على تضخيم الدنا. على الرغم من أهمية هذه الطرق في تشخيص اللشمانيا والأحياء الدقيقة

وتحديد أنواعها فإنها تواجه العديد من المشاكل التصنيفية، بالإضافة إلى النتائج الإيجابية الكاذبة الناجمة عن احتمال التلوث المتصالب. وتعاني هذه الطرق من أربعة مساوئ هي:

1- عدم وجود فروق بين اللشمانيا الطفيلية واللشمانيا الشاغاسية، مما يظهر أنهما نوعان متطابقان

2- لم تجزم لنا الطرق الجزيئية في ما إذا كانت طفيليات اللشمانيا تتكاثر جنسيا أم لا جنسيا . وجرى التفسير بوجود التشابه بين الجينات التي تعود لأنواع مختلفة من الطفيلي، كونه ناجما "عن التهجين بين هذه الأنواع نتيجة التزاوج الجنسي بينها

3- يمكن أن تتبدل نتائج طريقة RFLP عند حدوث طفرة نقطية لأن مثل هذه الطفرة تؤدي إلى تبدل موقع القطع، أو حدوث حذف أو إدخال تؤدي إلى تبدل حجم القطع الناتجة

4- صعوبة العمل بهذه الطرق والكلفة المادية الكبيرة (Schallig and Oskam, 2002)

2-11-5-2-1 تقنية توصيم ساوثرن:

تحتاج هذه الطريقة إلى زرع الطفيلي ثم جمع الطفيليات واستخلاص الدنا منها، ومن ثم إجراء رحلان كهربائي على الهلام، ثم إجراء توصيم ساوثرن، Southern Blottingوأخيرا" إجراء التهجين بمسابير الدنا التي تستهدف دنا منشأ الحركة. وجرى تطوير مسابير من دنا الحلقات الصغيرة لمنشأ الحركة لطفيليات اللشمانيا الكبرى L. major ولسلالات طفيليات اللشمانيا L. infantum الطفلية كما جرى وصف مجموعة من المسابير المشتقة من تسلسلات مختلفة من الدنا النووي مثل مسبار cDNA الحاوي عدة نسخ من تسلسل متكرر يبلغ طوله 60bpمعزول من اللشمانيا الدونوفانية L. donovani يتهجن نوعيا مع عزلات من معقد اللشمانيا الدونوفانية فقط.

(Schallig and Oskam, 2002 ; Cooper *et al.*, 1999)

2-11-5-2-2 تعيين نوع الطفيلي باستخدام تفاعلات PCR

تعد تفاعلات PCRالتي تستخدم مشارع خاصة ونوعية للطفيلي من أهم هذه الطرق. ويمكن استهداف مجالات متبدلة أو مصانة ضمن دنا الطفيلي باستخدام تفاعل الـ PCR. وتسمح هذه الطريقة بتمييز الطفيلي على مستوى الجنس باستخدام المشارع 13B/13Aأو على مستوى النوع، باستخدام مشارع تشخص اللشمانيا الدنوفانية مباشرة دون الحاجة إلى التقطيع بإنزيمات التقطيع (Salotra *et al.*, 2001) ، تستهدف هذه المشارع تسلسل دنا الحلقات الصغيرة في منشأ الحركة بطول، 792bp خاص باللشمانيا الدونوفانية وتتألف هذه المشارع من تسلسلات الدنا التالية: (Kumar *et al.*, 2007)

5\`-AAATCGGCTCCGAGGCGGGAAAC-3\`

5\`-GTACACTCTATCAGTAGCAC-3\`

كما استخدمت المشارع

5\`-TCGCAGAACGCCCCTACC-3\`

5\`-AGGGGTTGGTGTAAAAATAGGC-3\`

التي تستهدف أيضا" دنا الحلقات الصغيرة في منشأ الحركة للتمييز بين اللشمانيا الكبرى، حيث تعطي عصابة بطول ،620bp واللشمانيا المدارية حيث تعطي عصابة بطول 830bp .كما أدى تضخيم منطقة mini-exon في المجال غير المنتسخ، ووجود اختلافات في حجم الدنا وتسلسله، إلى تمييز أنواع اللشمانيا في العالم الحديث (Schallig and oskam, 2002).

2-11-5-2-3 طريقة التعدادات الشكلية للدنا المضخم عشوائيا Random amplified polymorphic DNA (RAPD):

إن تطبيق هذه الطريقة لا يحتاج إلى امتلاك معرفة مسبقة بتسلسل نوكليوتيدات الدنا الهدف، ولا يتطلب تهجين الدنا. وتستخدم هذه الطريقة مشرعا مفردا" لتسلسل عشوائي يلتحم بدرجة حرارة التحام منخفضة مع دنا العينة في مناطق مختلفة. ويؤدي إجراء الرحلان الكهربائي للدنا المضخم، إلى الحصول على نموذج لرحلان العصابات يعد كبصمة للدنا (Schallig and oskam, 2002)

من مساوئ هذه التقنية أنه لا يمكن تطبيقها إلا على طفيليات مزروعة خالية من الدنا المضيف الذي يمكن أن يقنع دنا الطفيلي. ولقد لوحظ وجود علاقة ارتباط وحيدة بين نمط رحلان العصابات الناتج بـ RAPD ونتائج تحليل النظائر الإنزيمية لدى مختلف عزلات اللشمانيا عند استخدام 6 مشرعات عشوائية مختلفة (Alimoradi *et al.*, 2009)

2-11-5-2-4 السوائل الصغرية microsatellite:

هي عبارة عن تكرارات ترادفية tandom repeat قصيرة يتراوح طولها ما بين 1-6 نوكليوتيدات. تتوزع هذه التكرارات ضمن الدنا النووي وتوجد في جينوم بدائيات النوى على حد سواء eukaryotic وحقيقيات النوى prokaryotic تتواجد هذه التكرارات في المجالات المرمزة وغير المرمزة وهي ذات قابلية عالية للتغير variable.

وتفيد هذه التكرارات في دراسة التعدد الشكلي، التنميط الجيني أيضا لأنها تنتشر بشكل كثيف جدا في الجينوم عند حقيقيات النوى، مما جعلها واصمات وراثية مفضلة كأهداف

تسمح بالتمييز بين السلالات التابعة لكل نوع مكنت تقنية السوائل الصغرية microsatellite من معرفة تصنيف السلالات المختبرة من خلال معرفة تسلسلات السوائل فيها حيث تملك كل سلالة أعدادا" وأطوال سوائل صغرية معينة خاصة بها، مما مكن من استخدامها لتمييز السلالات عن بعضها البعض. بالتالي سمح تضخيم هذه السوائل، باستخدام مشارع تلتحم مع السوائل الصغرية، بالحصول على مجموعة من قطع الدنا المضخمة ذات أعداد وأطوال مطابقة لأعداد وأطوال السوائل الصغرية لأحد السلالات المرجعية المعروفة التصنيف (Cooper *et al.,* 1999, Dib *et al.,* 1996, Knapik *et al.,* 1998)

5-2-5-11-2 PCR-RFLP

تستخدم هذه الطريقة الحيوية لتحديد التنوع الشكلي للجينات، genetic polymorphism والذي يعكس وجود تنوع في تتالي النوكليوتيدات للمناطق المستهدفة من الجينات، مختلف من نوع لشمانيا إلى آخر.

تعتمد هذه الطريقة على استخدام إنزيمات التقييد لتقطيع سلسلة الدنا المطلوب تشخيصها إلى قطع صغيرة. واستخرجت إنزيمات التقييد من أنواع مختلفة من البكتيريا وهي تمتلك القدرة على قطع سلاسل الدنا المضاعفة نتيجة قدرتها على التعرف والارتباط مع تسلسل نوعي من جزيء الدنا خاص يتراوح طوله بين 6–8 نوكليوتيدات.

وهي تتيح معرفة تسلسل الدنا بمعرفة عدد وطول الشدف الناتجة عن المعالجة بأحد إنزيمات التقييد. وبالتالي يسمح ترحيل الشدف الناتجة عن الهضم على الآغار ومقارنة عدد وطول القطع الناتجة مع الناتجة عن دنا سلالات أنواع مرجعية معروفة من طفيليات اللشمانيا بتشخيص نوع الطفيلي في حال وجود تشابه بين نمطي الرحلان.

أما في حال عدم وجود تطابق لنمط ترحيل دنا العينة المختبرة مع نمط ترحيل دنا المعياري، الذي يفترض أن تمثله العينة فإن ذلك يشير إلى اختلاف في تسلسل الدنا لجين معين، أي حدوث طفرة

فيها.

تسمح هذه التقنية بتحري عدة مناطق من الدنا المتوقع حدوث طفرات فيها. وتفصل نواتج هضم الدنا عن بعضها بالرحلان الكهربائي على الهلام، وفقا للحجم الجزيئي للشدف الناتجة استخدم الموقع الجيني لجين Gp63 بنجاح للتمييز الجيني بين عدد كبير من العزلات التي تنتمي إلى أربعة أنواع هي اللشمانيا لينسوني ،L.(V.)Lainsoni واللشمانيا الغويانية ،L.(V.)guyanensis واللشمانيا البيروفية ،L.(V.)peruviana واللشمانيا البرازيلية L.(V.)braziliensis. كما تم تمييز كل أنواع اللشمانيا الممرضة من خلال تطبيق هذه التقنية على ناتج تضخيم المجال المنتسخ الداخلي internal transcribed spacers (ITS) الواقع بين تحت الوحدة الصغيرة وتحت الوحدة الكبيرة لجين الرنا الريباسي rR (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008, Salotra *et al.*, 2001)

2-12- التشخيص التفريقي Differential Diagnosis:

من المهم تفريق اللشمانيا عن بعض الأمراض التي تتشابه معها في بعض الأعراض سواء فطرية أو طفيلية أو فيروسية أو جرثومية ومن أهم الأمراض التي يتم تفريقها عنها: الملاريا – الجذام – السل – الفطار البرعمي – النوسجات. (Mchugh *et al.*,1996)

2-13- المعالجة Treatment:

تعتمد المعالجة في داء اللشمانيا على نوعها وعمر المصاب والحالة الفيزيولوجية له وشكل الاندفاعات في اللشمانيا الجلدية. لذلك تعالج اللشمانيا من خلال العلاج العام عن طريق الحقن العضلي أو الوريدي أو الموضعي للاندفاعات الجلدية (Paniz Mondolti *et al.*, 2011).

2-13-1 العلاج عن طريق الحقن العضلي أو الوريدي:

2-13-1-1 مجموعة الأنتموان الخماسية التكافؤ:

أشهر مركباتها ميغلومين الأنتموان و ستيبوغلوكونات الصوديوم. يتصفان بفعالية علاجية عالية إذ تتراوح نسبة الشفاء من المرض 80-100% (Esfandiapour *et al.*, 2007).

يستخدم ستيبوغلوكونات الصوديوم لعلاج داء اللشمانيا الجلدي وداء اللشمانيا الجلدي المخاطي و داء اللشمانيا الحشوية في كل المناطق المصابة بهذا المرض باستثناء أوروبا والهند لأن سكانها يملكون مقاومة اتجاه هذا العقار وهذه المقاومة بسبب حجز الطحال لطفيليات اللشمانيا ضمن خلاياه وسرعان ما تزول هذه المقاومة عند استئصال الطحال. وأثناء العلاج يحتاج المرضى إلى تقييم وظائف القلب والكلى والتحاليل المخبرية. (Arevalo *et al.*, 2005 ; Esfandiarpour *et al.*, 2007 ; Hartzell *et al.*, 2008).

مركبات الأنتموان خماسية التكافؤ تتصف بآثار جانبية أثناء العلاج بها وتكون معتمدة أساسا على الجرعة ومدة العلاج حيث يظهر وهن عام وآلام مفصلية عضلية مع عدم ارتياح بطني ويعتبر الموت المفاجئ نادر الحدوث يترافق عادة مع استعمال جرعات عالية من هذا العقار ويمكن التكهن بمعدلات الشفاء العالية لتصل إلى 90-100% عند معالجة اللشمانيا الجلدية واللشمانيا الحشوية أما عند معالجة اللشمانيا الجلدي المخاطي يصل تكهن الشفاء إلى 50-70%
(Esfandiarpour *et al.*, 2007; Wortmann *et al.*, 2012).

2-13-1-2 مجموعة مركبات الأمفوترسين – ب:

تعتبر هذه المجموعة فعالة في علاج داء اللشمانيا الحشوي وداء اللشمانيا الجلدي المخاطي المقاومة لمركبات الأنتموان الخماسية حيث حققت معدل شفاء من داء اللشمانيا الحشوي بنسبة 100% ولكن السمية الكلوية ظهرت بشكل واضح وخاصة في مركب دي سوكسي كولات أمفوتيرسين – ب.

أما المركبات الشحمية للأمفوتيرسين – ب تتميز في علاج داء اللشمانيا باعتبارها ذات سمية كلوية أقل وتتكثف في الجهاز الشبكي البطاني ومنها الليبوزومال أمفوتيرسين– ب الفعال جدا في القضاء على اللشمانيا الحشوية عند الأطفال المقاومين من مركبات الانتموان الخماسية. (Hervas *et al.*, 2012 ; Navin *et al.*, 1992 ; Barratt *et al.*, 2005)

2-13-1-3 مجموعة مركبات الداياميدين:

أهم مركباتها البنتاميدين الفعال في كل أنواع داء اللشمانيا حيث يؤثر على الحمض النووي DNA وعلى المتقدرات ويعتبر بديل للحالات التي لا تستجيب للعلاج بمركبات الأنتموان الخماسية كما أنه يحتاج لجرعات عالية وفترة زمنية طويلة في علاج داء اللشمانيا الحشوي والجلدي المخاطي مما يجعله أقل قبول من مركبات الأمفوتيرسين– ب (Hellier *et al.*, 2000 ، Barratt *et al.*, 2005)

2-13-2 العلاج الموضعي في الآفات الجلدية:

2-13-2-1 العلاج بالتبريد Cryotherapy:

تعد هذه الطريقة من أفضل الطرائق المستخدمة في علاج حالات داء اللشمانيا غير المختلطة والمحددة. تتم بواسطة الأزوت السائل عند درجة –190° درجة مئوية تحت الصفر او باستخدام غاز النيتروز أو الثلج الفحمي عند درجة –70° درجة مئوية تحت الصفر. هذه الطريقة فعاليتها تكمن في أن طفيلي اللشمانيا حساس للحرارة المنخفضة إذ تؤدي هذه الطريقة إلى حدوث فصل بين طبقتي البشرة والأدمة فوق الغشاء القاعدي لذا لا يحدث تندب بعد عودة البشرة. تطبيق العلاج يعتمد على عمر ومكان الآفات ولهذه الطريقة عدة مضاعفات عند العلاج أهمها الألم والصداع والوذمة وتشكل

فقاعات (حويصلات) ضمن الأدمة ونقص اصطباغ مؤقت مكان تطبيق العلاج (Asilian *et al.*, 2003 ; Negera *et al.*, 2012).

2-2-13-2 العلاج الحراري thermotherapy:

مبدأ هذه الطريقة هو استخدام الحرارة الموضعية بدرجة بين (40-42ْ) درجة مئوية على الآفة المراد علاجها عدة ساعات يوميا. ويمكن تطبيق حرارة موضعية من مصدر حراري برفع درجة حرارة الآفة إلى 50ْ درجة مئوية لمدة 30 ثانية بعد تخدير الآفة موضعيا. يمكن استعمال الأشعة تحت الحمراء كمصدر حراري (Reithinger et a., 2007)

الفصل الثالث

Chapter three

مواد وطرائق العمل

Materials & Methods

3- مواد وطرائق العمل Materials & Methods

جُمعت في هذا العمل عينات دموية من كلاب مشتبهٌ بإصابتها بطفيلي اللشمانيا من محافظة حماة، وفق ما ذكرت المراجع من أعراض تظهر على الكلاب عند إصابتها بهذا الطفيلي (WHO, 2023). وأتبع ذلك بالحصول على الغلالة الشهباء من الدم بعد التثفيل واستخلص منها الـDNA .

تم إنجاز تفاعل البولميراز المتسلسل المعشش Nested-PCR على الـDNA المستخلص من خلال مرحلتين (مرحلة أولى PCR primary ومرحلة ثانية PCR Secondary)، وذلك لتأكيد الإصابة باللشمانيا أو نفيها، بالإضافة إلى تحديد نوع اللشمانيا اعتماداً على طول الشدفة الناتجة بعد تفاعل الـPCR الثاني (Van Eys *et al.*, 1991).

3-1-جمع العينات:

تم في هذا العمل فحص 43 عينة دم جمعت من كلاب (شاردة ومرباة في المنازل) مشتبه باصابتها بطفيلي اللشمانيا ما بين شهر تموز من عام 2021 وتشرين الثاني من عام 2023.

كانت كلاب مختلفة في العمر والسلالة، وكانت جميع الكلاب المستهدفة في جمع العينات تعاني من أعراض ظاهرية كالهزال أو ظهور آفات جلدية أو تساقط شديد للشعر مع التعب المستمر تدعو للشك باحتمال ولو بسيط بإصابتها باللشمانيا وذلك من مختلف مناطق محافظة حماة مع استقبال حالة واحدة من محافظة دمشق.

تم جمع الدم بواسطة محاقن معقمة ومن ثم وضعها في أنابيب تحتوي على مضاد التخثر E.D.T.Aوسجل على كل أنبوب البيانات الخاصة. نقلت العينات بالسرعة القصوى إلى مختبر الطفيليات في كلية الطب البيطري، وثفلت بسرعة 2500 RPM ولمدة 5 دقائق، من أجل جمع طبقة الغلالة الشهباء buffy coatالتي تتركز فيها الكريات البيض مما يزيد من دقة وحساسية الاختبار وذلك نظراً إلى ان طفيلي اللشمانيا يتكاثر داخل البلاعم ووحيدات النوى وقد يوجد في

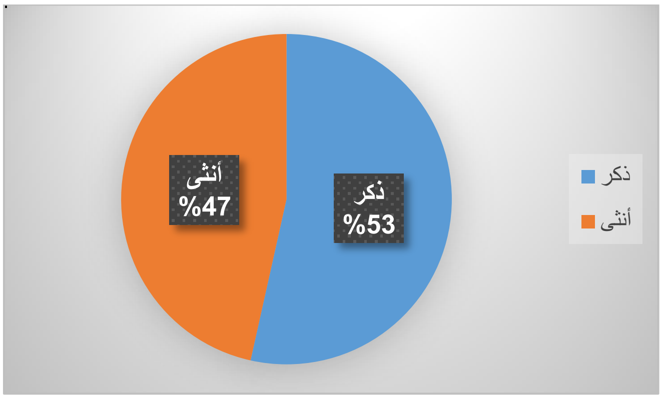
العدلات في بعض الحالات. نقلت الغلالة الشهباء إلى أنبوب ابندورف وحفظت على الدرجة -18 ريثما يتم العمل عليها واستخلاص المادة الوراثية منها.

3-2-توزيع العينات:

تكونت عينة البحث من 43 عينة، تمت دراستها على عدة متغيرات وذلك للإحاطة قدر الإمكان بكامل العوامل المؤثرة على انتشار داء اللشمانيا حيث تم توزيعها أولا حسب متغير الجنس (ذكر- أنثى) إلى 23 ذكر و 20 إناث.

الجنس	ذكر	انثى	المجموع
العدد	23	20	43

الجدول (1): يوضح مجموع العينات وتوزعها حسب متغير الجنس.

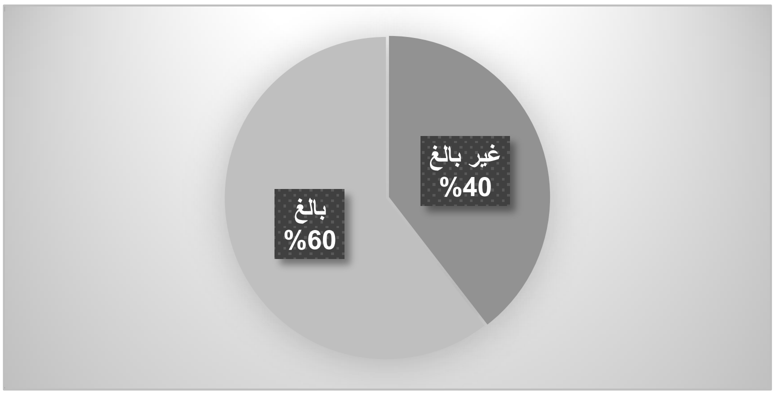


الشكل (1): النسبة المئوية لتوزيع العينة حسب متغير الجنس

كما توزعت العينة حسب متغير العمر (بالغ – غير بالغ) إلى 26 بالغ و17 غير بالغ.

الجدول (2): مجموع وتوزيع العينات حسب متغير العمر (بالغ –غير بالغ).

العمر	بالغ	غير بالغ	المجموع
العدد	26	17	43



الشكل (2): النسبة المئوية لتوزيع العينة حسب متغير العمر.

كما توزعت العينة حسب المكان (المنطقة الجغرافية) لتواجد الكلاب إلى أربع مناطق أو قطاعات في محافظة حماة فكان القطاع الأول يشمل الأحياء الجنوبية من المدينة (ضاحية أبي الفداء – جنوب الملعب – غرب المشتل – النقارنة) وكان عدد العينات فيه 9 عينات.

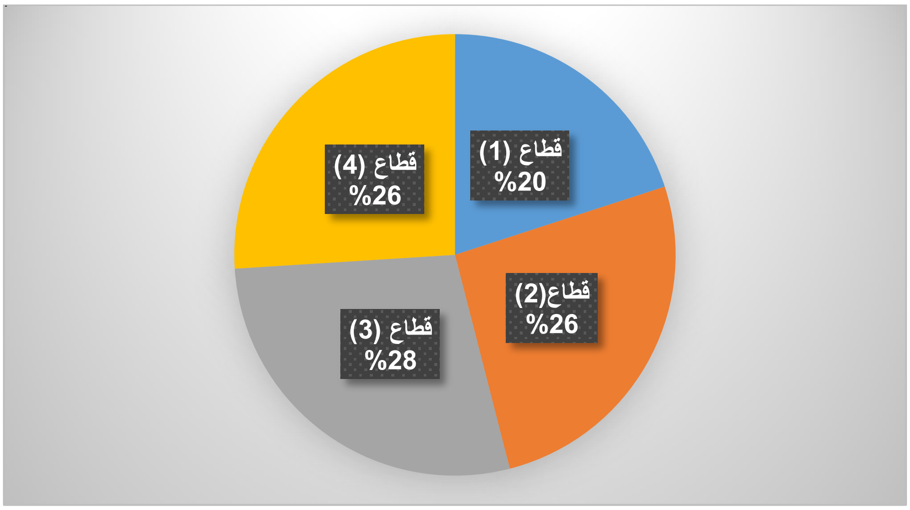
القطاع الثاني يشمل الأحياء الغربية من المدينة (حي الكرامة – كازو – طريق مصياف) وكان عدد العينات فيه 11 عينة.

القطاع الثالث يشمل الأحياء الشمالية الشرقية (القصور – الأربعين – المزارب – طريق حلب – الفيحاء) 12 عينة

القطاع الرابع من ريف حماة وكانت مدينة السلمية وكان عدد العينات فيها 11 عينة

الجدول (3): مجموع وتوزيع العينات حسب متغير المنطقة الجغرافية.

التوزيع الجغرافي	القطاع (1)	القطاع (2)	القطاع (3)	القطاع (4)	المجموع
العدد	9	11	12	11	43

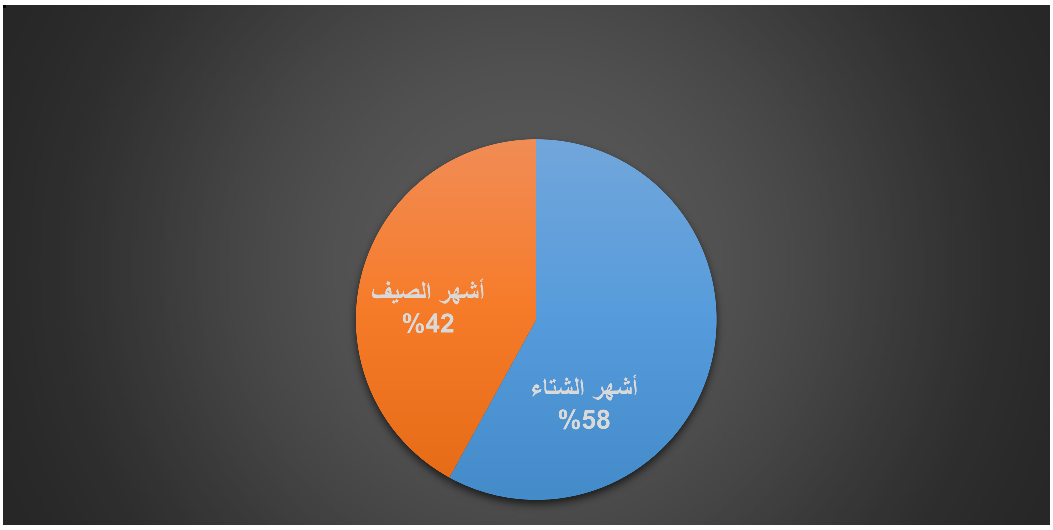


الشكل (3): النسبة المئوية لتوزيع العينات حسب المكان.

وتم دراسة العينة أيضا من حيث متغير الفصل الجوي على مدار السنة فقد تم جمع العينات على مدار السنة بين الصيف والشتاء فتم جمع 25 عينة ما بين أشهر الصيف (نيسان –أيار – حزيران – تموز – آب – أيلول) و 18 عينة ما بين أشهر الشتاء (تشرين الأول – تشرين الثاني – كانون أول – كانون ثاني – شباط – آذار)

الجدول (4): مجموع توزيع العينات حسب متغير الزمان.

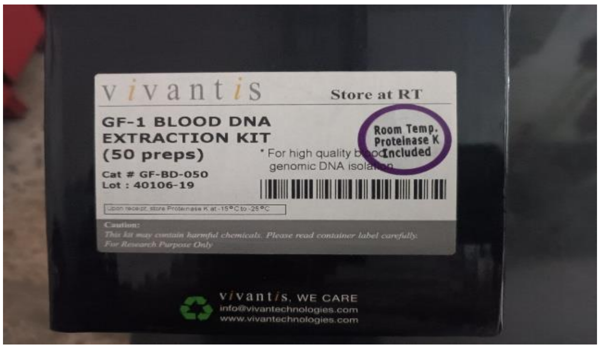
الزمن	أشهر الصيف	أشهر الشتاء	المجموع
العدد	25	18	43



الشكل(4): النسبة المئوية لتوزيع العينات حسب الزمن.

3-3-استخلاص الـDNA :

استخلص الـDNA من 200 μl من الغلالة الشهباء المعزولة من عينات الدم باستعمال عتيدة تجارية (كيت kit) GF-1 blood DNA extraction Kit من شركة Vivantis الماليزية والخاصة باستخلاص الـDNA من عينات الدم، والمعتمدة على مبدأ قدرة الأغشية المرشحة الزجاجية Glass filter membrane على انتقاء وربط الـDNA في حال وجد ضمن محلول كحولي يحتوي على تركيز عالي من بعض الأملاح. وذلك وفق التوصيات والتعليمات المذكورة من قبل الشركة المصنعة للعتيدة.



الصورة (11): صورة توضح الكيت المستخدم في الدراسة من شركة Vivantis الماليزية الخاص باستخلاص الDNA من عينات الدم

الصورة (12): صورة توضح محتويات الكيت والمحاليل المعتمدة فيه من قبل الشركة المصنعة.

3-4- تفاعل البولميراز المتسلسل المعشش:

تم الاعتماد على تفاعل البولميراز المتسلسل المعشش Nested – PCR والذي يتم عبر مرحلتين من أجل إنجاز تفاعلات التضخيم التي تهدف إلى تشخيص الإصابة وتأكيد وجود الطفيلي في العينات المجموعة (Harris *et al.*, 1998).

ووفق ما ذكرته العديد من المصادر والمراجع العلمية ذات الصلة.

تم هذا التفاعل بالاعتماد على أربعة تسلسلات من المرئسات النوعية (مشارع) Primers الخاصة بتسلسل الـkDNA الخاص بمنشأ الحركة Kinetoplast لطفيلي اللشمانيا، زوج من المرئسات لتفاعل PCR الأولى والزوج الاخر للتفاعل الثاني . والتي صممت من خلال تحديد المناطق لمحفوظة في تسلسل kDNA من أنواع طفيليات الليشمانية التالية Leishmania guyanensis, Leishmania peruviana, L. braziliensis, L. infantum, and Leishmania tropica.

حيث كان تسلسل أول زوج:

CSB2XF: (C/GA/GTA/GCAGAAAC/TCCCGTTCA)

CSB1XR: (ATTTTTCG/CGA/TTTT/CGCAGAACG)

أما تسلسل الزوج الثاني فقد كان:

13Z: ACTGGGGGTTGGTGTAAAATAG

LiR: TCGCAGAACGCCCCT

تـم الحصـول علـى المرئسـات السـابقة مـن شـركة Macrogen الكوريـة الجنوبيـة، وتسـتطيع هـذه المرئسات وبعد إتمام التفاعل الثاني أن تكشف وتميز بين الأنواع السابقة، إذ سوف نحصل على شدفة بطول 750 bp في حال وجدت الليشمانية المدارية L.tropica ، وبطول 680 bp لليشمانية الطفلية L.infantum، وبطول 560 bp في حال كانت اللشمانية الكبرى L.majorهي المسببة للمرض أو الآفات.

ولانجاز تفاعل PCR الأولي تم تحضير مزيج التفاعل بحجم 25 µl وتكون مما يلي وفق الجدول التالي وباستعمال عتيدة تجارية من شركة Vivantis الماليزية:

الجدول رقم (5): يوضح مكونات مزيج تفاعل PCR.

الكمية الداخلة في المزيج	المادة وتركيزها في محلولها الأساسي
3 µl	DNA
0.5 µl	PF (10 pmol\µl)
0.5 µl	PR (10 pmol\µl)
2.5 µl	BUFFER (10x)
2 µl	MgCl2 (50 mM)
0.25 µl	DNTPs (10 mM)

Taq (5U\µl)	0.25 **µl**
Water (to 25 µl)	16 **µl**

وزع مزيج تفاعلات PCR في انبيب خاصة سعة 200 µl ووضعت في جهاز المدور الحراري وفق البرنامج التالي للتفاعل الأول :

التمسخ الأولي 94°C لمدة 5 دقائق في دورة واحدة، ثم التضخيم بدورات عددها 35 دورة مؤلفة من ثلاث مراحل تبدا بدرجة حرارة 94°C لمدة 30 ثانية، تليها درجة التحام المرئسات 55°C لمدة دقيقة واحدة، وبعدها درجة الاستطالة وعمل إنزيم البوليميراز 72°C لمدة دقيقة ونصف. وفي النهاية دورة واحدة على الدرجة 72°C لمدة 5 دقائق تسمى الاستطالة النهائية.

أما في التفاعل الثاني فقد تم اللجوء إلى الزوج الثاني من تسلسلي المرئسات في إجراء التفاعل الثاني تفاعل البولميراز المتسلسل المعشش بهدف تضخيم القطعة المستهدفة، وذلك بمزيج وبرنامج تضخيم مطابق لما تم ذكره في التفاعل الأول، باستثناء أن قالب الـDNA المستعمل هنا هو عبارة عم 2 ul من ناتج تفاعل PCR الأولي ، مع تعديل كمية الماء لتصبح 17 ul .

3-5-الكشف عن نواتج الـPCR بوساطة الرحلان الكهربائي في هلامة الآغاروز:

أنجز الرحلان الكهربائي في هلامة الآغاروز بهدف الكشف عن الـDNA الجينومي المستخلص من الدم ومدى جودته، وكذلك للكشف عن وجود الشدف المضخمة بعد تفاعل PCR.

تم تحضير دارئة الرحلان (10X) TBE كما ذكرت المصادر العلمية (Harris *et al.*, 1998) ومددت إلى تركيز (1X) المناسب لتحضير هلامة الأغاروز والرحلان الكهربائي.

حُضرت هلامة الآغاروز بتركيز 1.5% وذلك بوزن كمية مناسبة من مسحوق الآغاروز تناسب الحجم النهائي المراد تحضيره وتم حلها في كمية مناسبة من الدارئة TBE وسخن المزيج في فرن الأمواج المكروية (مايكرويف) حتى الذوبان التمام لمسحوق الآغاروز .

ترك المزيج ليبرد حتى درجة 60°C تقريباً، وأضيفت بعدها كمية مناسبة من بروميد الإيثيديوم بواسطة ماصة مكروية ليصبح التركيز النهائي 0.5 µg لكل mL آغاروز، وتم سكب المزيج في قوالب الهلامات المناسبة التي ركبت عليها أمشاطها الخاصة.

بعد الانتظار لفترة واكتمال تبلمر الهلامة نزعت الأمشاط لتشكل أسنانها حفراً بعد نزعها ووضعت الهلامة في جهاز الرحلان وغمرت بكمية مناسبة من المحلول الدارئ.

مزج 10 µl من ناتج تفاعل البولميراز المتسلسل من كل عينة مع 2 µl من دارئة التحميل Loading dye ذات تركيز 6 X ونقل المزيج باستخدام ماصة مكروية مناسبة إلى إحدى حفر الهلامة المغمورة والموضوعة داخل جهاز الرحلان وطبقت هذه العملية على كافة العينات.

وضع في الحفرة اليسارية الأولى من حفر الهلامة واسم الأطوال المعياري (DNA Ladder)

ثم تم وصل جهاز الرحلان للتيار الكهربائي وطبق فرق الكمون بمقدار 100 فولت وبعد فترة كافية من الرحلان تم فحص الهلامة على جهاز توثيق الهلامة بالأشعة فوق البنفسجية لتحري وجود أنطقة الـDNA المطلوبة حيث تم الاستدلال عليها مقارنة مع سلم الأطوال.

.

الصور (13): صور توضح تطبيق الرحلان الكهربائي على هلامة الآغاروز

الفصل الرابع

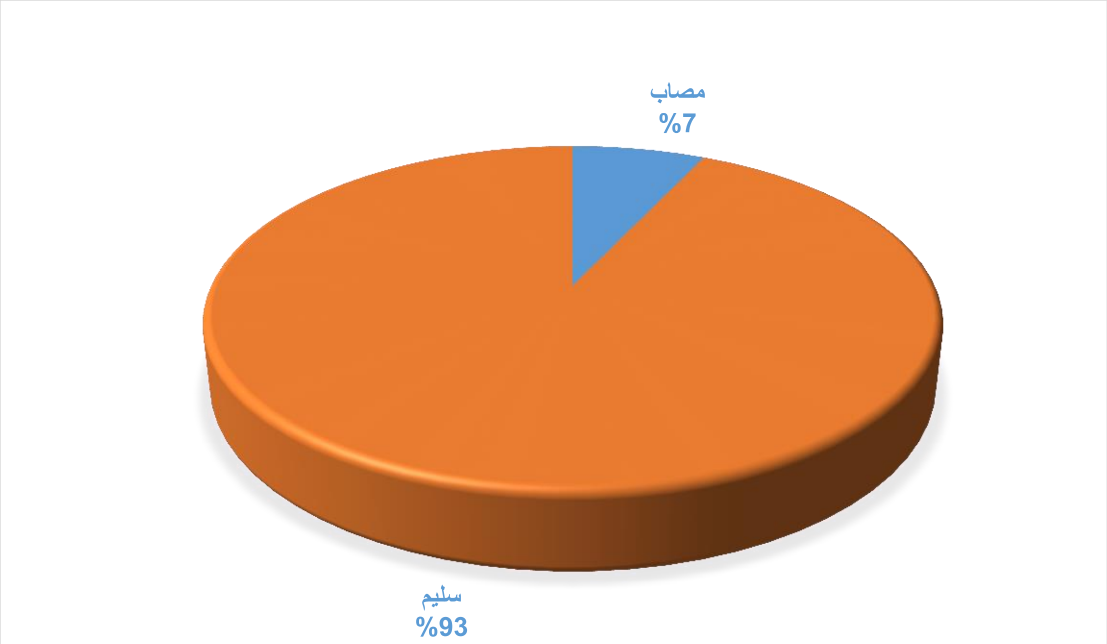
Chapter four

النتائج

results

النتائج results :

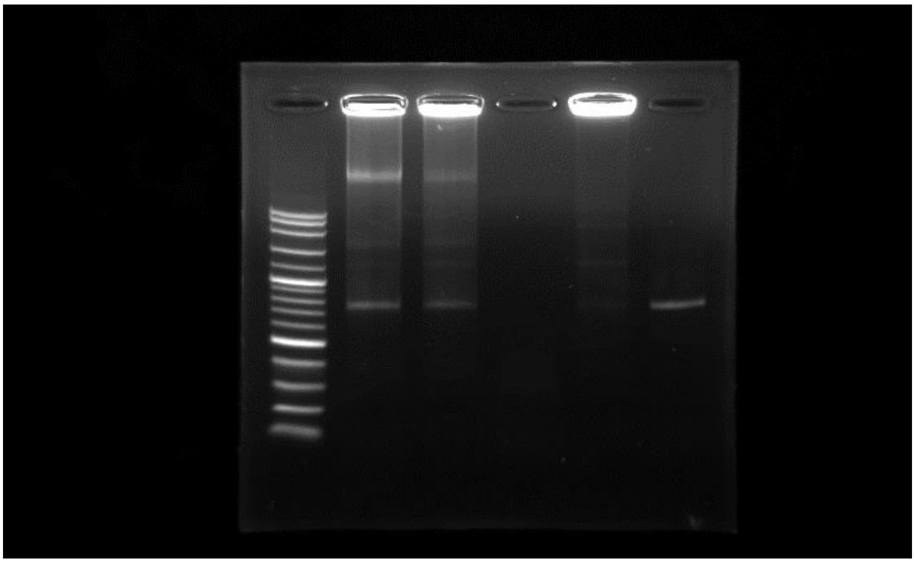
تم الكشف عن طفيليات داء اللشمانيا في 3 كلاب من العينات التي تم فحصها والبالغ عددها 43 كلب وذلك نتيجة الفحوصات باستخدام تحليل Nested-PCR على الDNA المستخلص من خلال مرحلتين وذلك لتأكيد الإصابة أو نفيها أولا ومن ثم تحديد نوع اللشمانيا اعتمادا على طول الشدفة الناتجة بعد المرحلة الثانية. والشكل (1) يوضح النسبة المئوية لعدد العينات المصابة بداء اللشمانيا في عينات الدراسة والنسبة المئوية لعدد العينات السليمة.



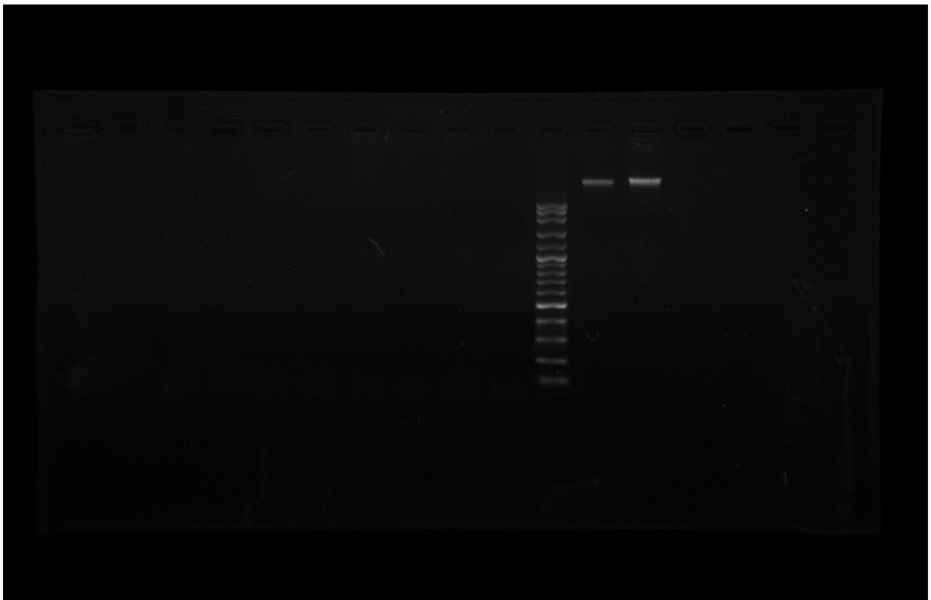
الشكل(5): النسبة المئوية لنسبة العينات (مصاب -سليم)

تم تشخيص ثلاث حالات إيجابية مصابة بداء اللشمانيا ضمن عينات البحث المكونة من 43 عينة أي بنسبة 7% كما تم توضيحه في الشكل(1)، كانت كامل العينات المصابة بداء اللشمانيا من نوع L.tropica المسببة للشمانيا الجلدية.

حيث تم تحديدها بعد التفاعل الثاني باستخدام تحليل Nested-PCR على الDNA المستخلص ومقارنة النتائج مع مسطر الأطوال لنلاحظ أن طول الشدف 750 bp وهو طول اللشمانيا المدارية (L.tropica)



صورة (14): توضح النتائج الإيجابية التي تم الكشف عنها في تحليل عينات البحث.



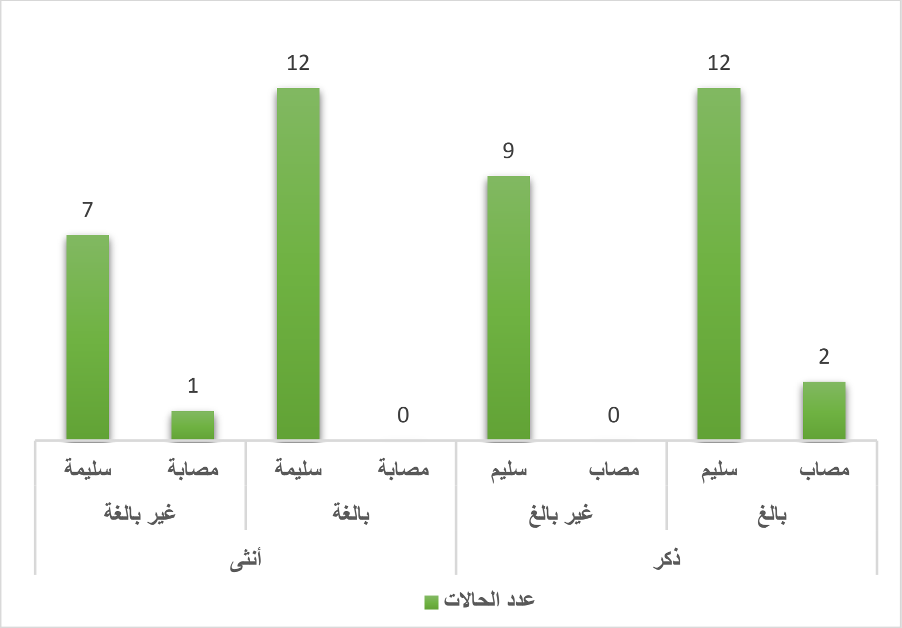
صورة (15): توضح النتائج السلبية التي تم الكشف عنها في تحليل عينات البحث.

وبدراسة هذه النتائج على مستوى عينة البحث تم توزيع العينات حسب المتغيرات المذكورة مسبقا ودراستها من حيث الجنس والعمر على حدى ودراسة كل من متغيري الزمان والمكان على حدى بشكل مستقل.

4-1- دراسة الحالات المصابة حسب متغيري الجنس والعمر:

4-1-1- توزيع الحالات المصابة بمرض اللشمانيا ضمن عينة البحث حسب متغيري الجنس والعمر:

تعود حالتين من الكلاب الحاملة لداء اللشمانيا إلى ذكور بالغة مصابة بينما الإصابة الثالثة كانت تعود لكلبة أنثى غير بالغة وكان توزيع بقية الكلاب السليمة 12 كلب ذكر بالغ سليم و9 كلاب غير بالغة سليمة أما الإناث البالغة السليمة فعددها 12 كلبة و7 كلبات سليمة غير بالغة



الشكل (6) توزيع الحالات حسب متغيرات الجنس والعمر والإصابة.

4-1-2-أثر متغير الجنس في الإصابة بمرض اللشمانيا ضمن عينة البحث :

ولدراسة ما إذا كان لمتغير الجنس أثر في الإصابة، تمت دراسة دلالة الفروق في حالات الإصابة حسب متغير الجنس باستخدام chi square (كاي تربيع) الموضحة نتائجه في الجدول:

الجدول(6): نتائج اختبار كاي تربيع لدراسة دلالة الفروق في حالات الإصابة وفقا لمتغير الجنس.

متغير الجنس	متغير الإصابة	العدد	قيمة كاي تربيع	قيمة مستوى الدلالة	دلالة الفروق
ذكر	سليم	21	0.22	0.64	لا توجد فروق دالة
	مصاب	2			
أنثى	سليمة	19			
	مصابة	1			

يبين الجدول (6) بعد توضيح التوزيع بين العينات المصابة والسليمة تبعا للجنس (ذكر-أنثى) بأنه كان لدينا حالتين مصابة من الكلاب الذكور والسليمة 21 كلب ذكر بينما الإناث السليمة كانت 19 كلبة والمصابة كانت كلبة واحد وبعد دراسة قيمة كاي تربيع والتي كانت 0.22 وأن قيمة مستوى الدلالة قد بلغت 0.64 وهي قيمة أكبر من (0.05) وبالتالي يمكن القول بأنه عند مستوى حد الثقة 95% لا يوجد فروق معنوية ذات دلالة إحصائية في حالات الإصابة باللشمانيا بين الكلاب الذكور والإناث .

وبالتالي يمكن القول بأنه لا يوجد أثر ذو دلالة إحصائية لمتغير الجنس (ذكور -إناث) في حالات الإصابة باللشمانيا ضمن عينة البحث.

4-1-3-أثر متغير العمر في الإصابة بمرض اللشمانيا ضمن عينة البحث:

ولدراسة ما إذا كان لمتغير العمر أثر في الإصابة، تمت دراسة دلالة الفروق في حالات الإصابة وفقا لمتغير العمر. باستخدام اختبار chi square (كاي تربيع) الموضحة نتائجة في الجدول:

الجدول(7): نتائج اختبار كاي تربيع لدراسة دلالة الفروق في حالات الإصابة وفقا لمتغير المر.

متغير العمر	متغير الإصابة	العدد	قيمة كاي تربيع	قيمة مستوى الدلالة	دلالة الفروق
بالغ	سليم	24	0.05	0.82	**لا توجد فروق دالة**
	مصاب	2			
غير بالغ	سليم	16			
	مصاب	1			

يوضح الجدول (7) بعد بيان التوزيع للعينات المصابة والسليمة حسب متغير العمر (بالغ – غير بالغ) بأن الكلاب البالغة السليمة تبلغ 24 كلب وحالتين من الكلاب المصابة بينما كانت الكلاب السلمية غير البالغة تبلغ 16 كلب والمصابة كلب واحد فقط وبعد دراسة قيمة كاي تربيع وجد أنها 0.05 كانت قيمة مستوى الدلالة قد بلغت 0.82 وهي قيمة أكبر من 0.05 وبالتالي يمكن القول بأنه عند مستوى الثقة 95% لا يوجد فروق ذات دلالة إحصائية في حالات الإصابة باللشمانيا بين الكلاب البالغة وغير البالغة .

وبالتالي يمكن القول بأنه لا يوجد أثر ذو دلالة إحصائية لمتغير العمر (بالغ-غير بالغ) في حالة الإصابة باللشمانيا ضمن عينة البحث.

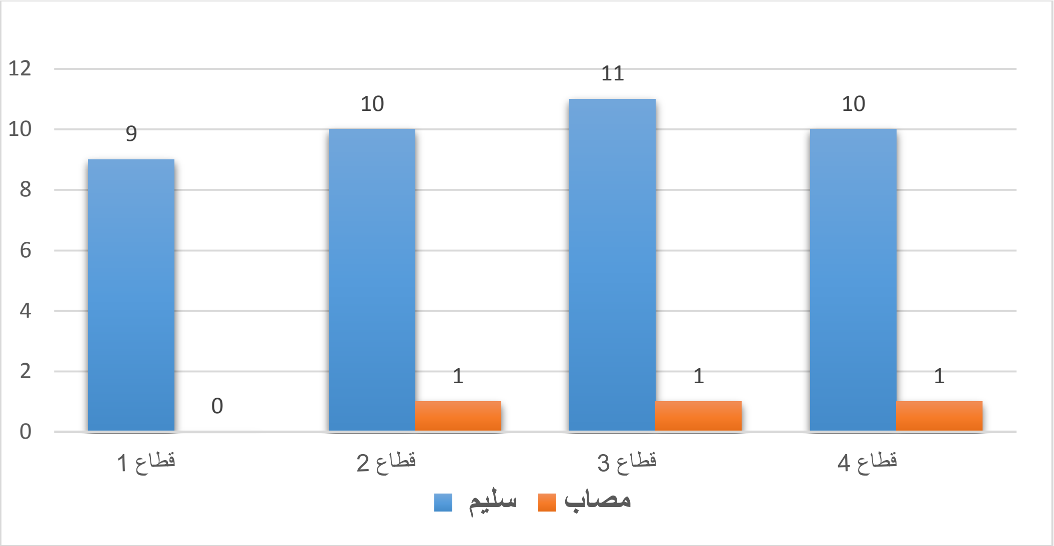
4-2-دراسة الحالات المصابة حسب متغير المكان(المنطقة الجغرافية) :

4-2-1 توزيع الحالات المصابة حسب متغير المكان (المنطقة الجغرافية):

بدراسة الحالات المصابة حسب المناطق التي جمعت منها العينات المدروسة والتي تم توضيحها مسبقا في توزيعها كان القطاع الأول (المنطقة الجنوبية) خالي من الإصابات من ضمن عينات البحث المدروسة والبالغ عددها تسع عينات، بينما تم تشخيص حالة إيجابية واحدة في القطاع الثاني (المنطقة الغربية) من أصل مجموعة عينات البحث المدروسة في المنطقة البالغ عددها 11 عينة. كما تم تشخيص حالة إيجابية واحدة أيضا في القطاع الثالث (المنطقة الشرقية الشمالية) من أصل مجموعة عينات البحث المدروسة في المنطقة البالغ عددها 12 عينة. وأخيرا في القطاع الرابع (مدينة السلمية) تم تشخيص حالة إيجابية واحدة من أصل مجموعة عينات البحث المدروسة في المنطقة البالغ عددها 11 عينة.

الجدول (8): توزيع ونسبة الحالات المصابة والسليمة حسب متغير المنطقة الجغرافية.

	القطاع (1)	القطاع (2)	القطاع (3)	القطاع (4)
سليم	9	10	11	10
مصاب	0	1	1	1
نسبة المصابين	%0	%9	%8	%9
المجموع	9	11	12	11



الشكل(7): توزيع الحالات حسب متغير المنطقة الجغرافية.

4-2-2دراسة أثر متغير المكان (المنطقة الجغرافية) في الإصابة بمرض اللشمانيا ضمن عينة البحث:

لدراسة ما إذا كان لمتغير المنطقة أثر في الإصابة تمت دراسة دلالة الفروق في حالات الإصابة حسب متغير المكان باستخدام chi square (كاي تربيع) الموضحة نتائجه في الجدول

الجدول(9): نتائج اختبار كاي تربيع لدراسة دلالة الفروق في حالات الإصابة وفقا لمتغير المكان.

متغير المنطقة	متغير الإصابة	العدد	قيمة كاي تربيع	قيمة مستوى الدلالة	دلالة الفروق
منطقة (1)	سليم	9	0.08	0.87	لا توجد فروق دالة
	مصاب	0			
منطقة(2)	سليم	10			
	مصاب	1			

منطقة(3)	سليم	11			
	مصاب	1			
منطقة(4)	سليم	10			
	مصاب	1			

يوضح الجدول (9) بعد بيان توزيع العينات المصابة والسليمة حسب متغير المكان (المنطقة الجغرافية) أن القطاع الأول فيه تسع كلاب سليمة ولا يوجد كلاب مصابة بينما في المنطقة (2) كان فيها عينة مصابة واحدة و وعشر عينات سليمة بينما المنطقة (3) كانت العينات السليمة فيها 11 عينة والمصاب عينة واحدة وفي المنطقة الرابعة كانت العينات السليمة فيها 10 عينات والمصاب عينة واحدة. وبدراسة قيمة كاي تربيع كانت 0.08 لتكون قيمة مستوى الدلالة قد بلغت 0.87 وهي قيمة أكبر من (0.05) وبالتالي يمكن القول بأنه عند مستوى الثقة 95% لا يوجد فروق ذات دلالة إحصائية في حالات الإصابة باللشمانيا بين المناطق الأربعة التي تم منها سحب العينات.

وبالتالي يمكن القول بأنه لا يوجد أثر ذو دلالة إحصائية لمتغير المكان (المنطقة الجغرافية) في حالات الإصابة بداء اللشمانيا ضمن عينة البحث.

4-3- دراسة الحالات المصابة حسب متغير الزمن (الفصل):

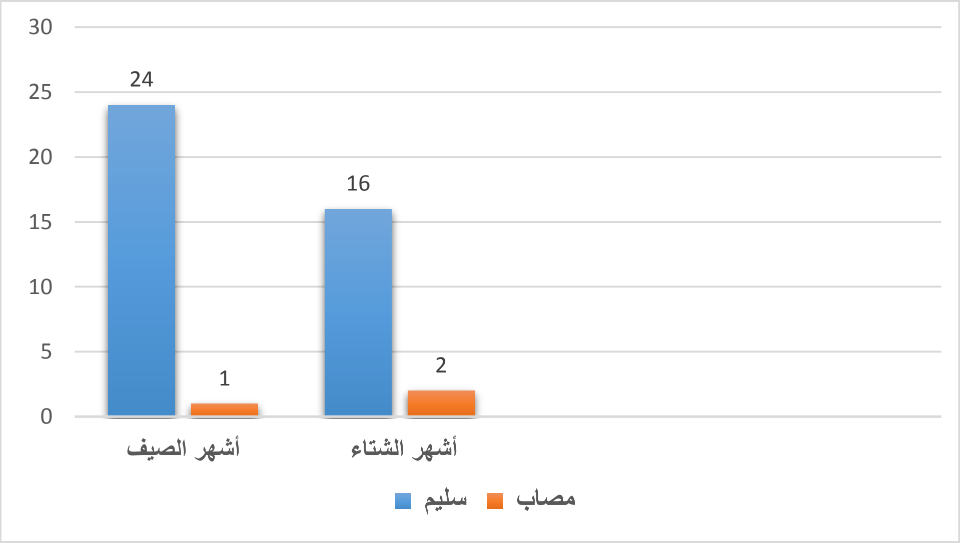
4-3-1 توزيع الحالات المصابة حسب متغير الزمن:

بدراسة الحالات المصابة حسب الوقت الذي تم فيه جمع العينات المدروسة والتي تم توضيحها مسبقا في توزيعها كانت الحالات المصابة المأخوذة في فصل الشتاء حالتين بينما السليم كان 16 حالة من أصل عينات البحث المدروسة بينما كانت الحالات المصابة المأخوذة في فصل الصيف تبلغ عينة واحدة في حين كان العينات السليمة تبلغ 24 عينة من أصل مجموعة عينات البحث المدروسة.

	أشهر الصيف	أشهر الشتاء

الجدول (10): توزيع الحالات المصابة والسليمة حسب متغير الزمن.

سليم	24	16
مصاب	1	2
نسبة المصابين	%4	%11
المجموع	25	18



الشكل(8): توزيع الحالات المصابة والسليمة حسب متغير الزمن.

4-3-2 دراسة أثر متغير الزمن (الفصل) في الإصابة بمرض اللشمانيا ضمن عينة البحث:

لدراسة ما إذا كان لمتغير الزمن أثر في الإصابة تمت دراسة دلالة الفروق في حالات الإصابة حسب متغير الزمن باستخدام chi square (كاي تربيع) الموضحة نتائجه في الجدول

الجدول (11): نتائج اختبار كاي تربيع لدراسة دلالة الفروق في حالات الإصابة وفقا لمتغير الزمن.

متغير الزمن	متغير الإصابة	العدد	قيمة كاي تربيع	قيمة مستوى الدلالة	دلالة الفروق
فصول الصيف	سليم	24	0.05	0.81	**لا توجد فروق دالة**
	مصاب	1			
فصول الشتاء	سليم	16			
	مصاب	2			

يوضح الجدول (11) بعد بيان توزيع العينات المصابة والسليمة حسب متغير الزمن أن الكلاب المصابة في فصول الصيف كانت حالة واحدة بينما الكلاب السليمة كانت 24 حالة، بينما كان عدد الكلاب المصابة في فصول الشتاء حالتين مع 16 حالة من الكلاب كان خاليا من المرض وبدراسة قيمة كاي تربيع كانت تساوي 0.05 وأن قيمة مستوى الدلالة قد بلغت 0.82 وهي قيمة أكبر من (0.05) وبالتالي يمكن القول بأنه عند مستوى الثقة 95% لا يوجد فروق ذات دلالة إحصائية في حالات الإصابة باللشمانيا بين الكلاب حسب متغير الزمن

وبالتالي يمكن القول بأنه لا يوجد أثر ذو دلالة إحصائية لمتغير الزمن (الفصل) في حالات الإصابة بداء اللشمانيا ضمن عينة البحث.

الفصل الخامس

Chapter five

المناقشة

Discussion

5- المناقشة : Discussion

داء اللشمانيا من الأمثلة الهامة والنموذجية عن الأمراض المشتركة بين الإنسان والحيوان حيث يصاب الإنسان بأنواع اللشمانيا المختلفة والذي يظهر بعدة أشكال سريريا، يعتبر طفيلي اللشمانيا العامل المسبب لهذا المرض وهو من الطفيليات وحيدات الخلية المسوطة والمحمولة بواسطة ناقل Vector-born parasites. حيث يعتمد توزع المرض الجغرافي على وجود ناقلات ذباب الرمل والخازن الحيواني إذ تعتبر الكلاب في جنوب أوروبا خازن رئيسي للعدوى (CDC, 2011; Hazar *et al*., 2002)

تعد سورية من المناطق الموبوءة باللشمانيا ومع ملاحظة انتشارها في الفترات الأخيرة جعلها من المشاكل الصحية التي تستوجب الدراسة. (Postigo, 2010).

وتم دراسة اللشمانيا من حيث الانتشار سابقا في محافظة حماة عند البشر (الحنبطلي 2018) ولكن دراستنا كانت الأولى من نوعها حيث ركزت على انتشار اللشمانيا عند الكلاب وقد أجرينا الدراسة على مجموعة من الكلاب المشتبه بإصابتها سواء كانت شاردة او مستأنسة في المنازل وتم ذلك عن طريق سحب عينات دم وفحصها بواسطة تفاعل البولميراز المتسلسل المعشش Nasted-PCR والتي تعد من التقنيات الحديثة والحساسة جدا في تشخيص طفيليات اللشمانيا في الدم ونخاع العظم والعقد اللمفية والطحال (Van Eys *et al*., 1985).

وقد اكتشف هذه التقنية العالم الأمريكي Kary Mullis عام 1983 والذي مكن الباحثين من خلال اختراعه في مجال الأحياء الجزيئي من مضاعفة الDNA لملايين النسخ من قطعة صغيرة منه، إذ ساهم هذا الاختراع في تشخيص الإصابة بالأحياء الدقيقة من خلال الحمض النووي (Mullis *et al*., 1985).

وتم استخدام تقنية التفاعل السلسلي للبوليمراز PCR للكشف عن طفيليات اللشمانيا في العينات السريرية وخاصة تلك الحالات المشتبه بها أنها داء اللشمانيا (Mathis and Deplaz, 1995)، حيث بينت العديد من الدراسات أن تقنية تفاعل البولميراز المتسلسل PCR هي الأكثر خصوصية وحساسية من الطرائق الأخرى ويمكن فيها استخدام الدم أو المادة المأخوذة من الخزعة للآفات الجلدية وكذلك نخاع العظم ونقاط الدم المجموعة على ورق الترشيح (Meredith *et al.*, 1993)، وتعد هذه العملية مهمة في التشخيص الروتيني في المختبرات في جميع أنحاء العالم اعتمادا على تلك الخصائص الجزيئية (Van Eys *et al.,* 1989) و(Lachand *et al.*, 2000) حيث تم استخدام هذه التقنية في العديد من الأبحاث العلمية مثل العراق (الموسوي 2006) وإيطاليا واسبانيا (Gallego *et al.,* 2007) والبرازيل (Andrade 2006).

تناولت هذه الدراسة نسبة انتشار داء اللشمانيا في محافظة حماة عند الكلاب السائبة والمنزلية ودراسة النوع الموجود في العينات المصابة وتبين لنا أن نسبة انتشار اللشمانيا عند الكلاب في محافظة حماة بلغت 7% من مجموع الكلاب المفحوصة وهي من نوع اللشمانيا المدارية (L.tropica) المسببة لداء اللشمانيا الجلدية عند الإنسان، تعتبر هذه النتيجة مرتفعة بالمقارنة مع دراسة الباحثين (Hassan *et al.*, 2009) التي أجروها في محيط نهر الرهد شرقي السودان على 87 كلبا وكانت نسبة الإصابة باللشمانيا تبلغ 2.3% وجميعها من نوع (L.donovani).

وأيضا بالمقارنة مع نتائج دراسة الباحث (رافد عبد الواحد، 2009) حول نسبة انتشار اللشمانيا عند الكلاب كانت نسبة انتشار الإصابة فيها 3.6% وهي منخفضة مع نسبة انتشار دراستنا.

وتعتبر نتائج دراستنا منخفضة بالمقارنة مع الدراسة التي أجراها الباحث (جوهر ،2012) في مدينة الموصل في العراق حيث قام بفحص 156 كلبا وكانت نسبة الإصابة فيها تبلغ 14% وهي ومن نوع (L. infantum) و(L.donovani) المسببة لداء اللشمانيا الحشوية، كما كانت النتائج أيضا

منخفضة بالمقارنة مع نتائج دراسة (العبيدي 2019) التي تم فيها فحص 80 كلبا بلغت نسبة الإصابة بالمرض 55% في محافظة نينوى في العراق والإصابات كانت من نوع (L.chagasi (L.donovani)).

واختلفت نتائج هذه الدراسة مع الدراسة التي أجراها الباحث (rosypal, 2009) في فيتنام والتي كانت نتيجة دراسته عدم وجود إصابة بداء اللشمانيا عند الكلاب.

وبالمقارنة مع نتائج الدراسات التي أجراها الباحثين (Santaella *et al.,* 2009) في كولومبيا وفي مدينة شابارال تحديدا كانت نسبة الإصابة بالمرض بين الكلاب تبلغ 20%.

أما في جبال الأنديز في البيرو كانت نسبة الإصابة بداء اللشمانيا بين الكلاب 5.4% حسب دراسة (Llanos *et al.,* 1999) والإصابات من نوع (Leishmania Viannia).

وفي دراسة انتشار اللشمانيا عند البشر التي أجراها (الحنبظلي، 2018) في محافظة حماة كانت الإصابات البشرية أغلبها من نوع (L.tropica) وهذا توافق مهم مع نتائج دراستنا هذه حيث كما أشرنا سابقا أن هذا النوع من اللشمانيا كان في جميع العينات التي تم تشخيصها بنتيجة إيجابية من العينات المدروسة وقد أكد الحنبظلي أن الأحياء المتطرفة في المدينة مع البيئة الريفية تلعب دورا هاما في توفير الظروف البيئية لتكاثر ذبابة الرمل الناقل لداء اللشمانيا بالإضافة لوجود الكلاب كثوي خازن يلعب دورا مهما في انتشار المرض.

أما في دراسة (Millán *et al.,* 2011) في مايوركا في إسبانيا كانت تؤكد على دور الكلاب الأساسي كخازن رئيسي للمرض بالإضافة إلى القطط البرية والسمور حيث يمكن اعتبارها كمضيف أولي أو ثانوي محتمل للإصابة.

في دراسة (Dantas-Torres, 2007) في البرازيل كانت نتائج الدراسة تشير إلى أن الكلاب تلعب دورا مهما كخازن لداء اللشمانيا ولكن من يلعب الدور الأهم والأكبر في نقل المرض هو الإنسان الذي يعتبر خازن رئيسي للمرض.

وكان (Segura, 2023) قد اتجه مع نفس النتائج على أن الكلاب لا تمثل مصدر جيد للعدوى في جنوب الهندوراس حيث كانت التوصيات بالتحقيق من الحيوانات الأليفة أو البرية الأخرى في المناطق الموبوءة لانتقال داء اللشمانيا إلى البشر.

وأشارت دراستنا هذه أن نسبة الإصابة حسب متغير الجنس لا يوجد فيها فروق معنوية وهذا ما توافق مع دراسة (رافد عبد الواحد ورفاقه، 2009) في مدينة بغداد في العراق حيث تم دراسة 191 عينة دم جمعت من الكلاب لم تلاحظ أيضا عنده أي فروق معنوية بين نسب الإصابة المسجلة بين الذكور والإناث فكانت نسبة إصابة الذكور 4.3% أما الإناث 3%.

وفي المقابل تعارضت دراستنا مع دراسة (Idrissi ,2021) في المغرب حيث كان يوجد فروق معنوية حسب متغير الجنس فكانت نسب الإصابة المسجلة عند الذكور 60% وعند الإناث 40%.

وتعارضت أيضا مع دراسة (ازدهار الموسوي، 2006) حيث كانت يوجد فروق معنوية واضحة في نسبة إصابة الذكور للإناث في دراسة أجرتها في بعض محافظات العراق عند البشر وأظهرت نتائج الدراسة تفوق إصابة الذكور بنسبة 58% إلى الإناث بنسبة 42%.

وقد أظهرت دراستنا توافق مع دراسة (الحساني، 2012) في محافظة القادسية في العراق حول انتشار اللشمانيا عند البشر من ناحية تأثير متغير الجنس حيث لوحظ عدم وجود فروق معنوية مهمة إحصائيا حيث تقاربت نسبة إصابة الذكور إلى الإناث فكانت (53.3%) و (46.6%) على التوالي أما من ناحية الفئة العمرية فقد تعارضت نتائجه مع نتائج دراستنا فكانت نسبة الإصابة عالية في

الأعمار الصغيرة (مرحلة ما قبل البلوغ) حيث ظهرت فروق معنوية مهمة أما في دراستنا لم تظهر أي فروق معنوية من ناحية العمر سواء كان بالغ أو غير بالغ.

وفي دراستنا لانتشار اللشمانيا حسب متغير الزمن كانت تشير إلى ارتفاع نسبة الإصابة في فصول الشتاء بالمقارنة مع فصول الصيف حيث بلغت في فصل الشتاء 11% بينما 4% في فصل الصيف وهذا ما توافق مع دراسة (الحساني 2012) حيث كانت تشير إلى أن أعلى نسبة إصابة باللشمانيا كانت في كانون الثاني (الشتاء) وأقل نسبة لها في شهر آب (الصيف).

وتتوافق النتائج مع دراسة (الحنبظلي 2018) التي أشارت إلى أن أعلى نسبة انتشار للشمانيا كانت في مدينة حماة في شهري شباط وآذار (شتاء) وأدنى نسبة انتشار كانت في شهري تموز وآب (الصيف).

وفي دراسة (رافد عبد الواحد 2009) كانت النتائج تشير إلى ارتفاع نسبة الإصابة في شهر شباط وتدنيها في شهر تشرين الثاني وهذا ما تعارض مع نتائج دراستنا هذه فالنتائج كأعلى وأدنى حد كانت لديه ضمن الأشهر الشتوية.

وكانت دراسة (Dantas-Torres, 2007) تؤيد نفس النتائج إلى أن الكلاب تلعب دورا مهما في نقل اللشمانيا إلى الإنسان مع تسليط الضوء على عدم فائدة إعدام الكلاب المصابة لمكافحة داء اللشمانيا كوجهة نظر إنسانية غير أخلاقية وغير مبررة من وجهة نظر علمية والعمل على استخدام أساليب وقائية أخرى وذلك في اعتراض على بيان منتدى الأمراض المنقولة بالنواقل المرافقة في ندوته الثالثة عشر عام 2018 الذي كان يوصي بفائدة إعدام الكلاب كوسيلة للسيطرة على داء اللشمانيات.

وأخيرا وبعد النظر إلى كامل المقارنات السابقة فنرى أن دراستنا قد وافقت عدة دراسات على أن الكلاب ممكن أن تلعب دورا مهما في نقل داء اللشمانيا إلى الإنسان وخاصة في دراسة الحنبظلي التي كانت في نفس المنطقة الجغرافية التي تمت فيها دراستنا وقد اشتركت معه بالنتائج من حيث نسبة الانتشار ونوع الطفيلي الموجود في العينات المكشوف عنها مما يوثق فكرة الارتباط ما بين الإصابات البشرية والإصابة لدى الكلاب.

وبالنسبة للدراسات التي تعارضت مع نتائج دراستنا من حيث نسبة الانتشار فيمكن أن تكون اختلاف الظروف التي تمت فيها الدراسات ذات دور مؤثر فمنها كان على البشر بشكل عام ومنها ما كان ضمن المشافي لدى أشخاص تم تشخيص إصابتهم مسبقا وتم فحصهم أيضا بواسطة كواشف مسح سريعة.

أما من ناحية المتغيرات فيمكن للعدد الذي تمت عليه دراستنا تأثير على النسب الظاهرة حيث كان للعائق اللوجستي في تأمين المواد وتكاليفها الباهظة دور في تحديد عدد العينات المدروسة ومن ناحية أخرى اختلاف الظروف البيئية بين الدول المطروحة في المقارنات مع ظروف المنطقة الجغرافية في دراستنا فلا يمكن المقارنة بشكل جيد بين ظروف معيشة البشر والبيئة التي يمكن أن تعيش فيها الكلاب السائبة عدى عن تأثير الحرب عليها وعلى الدراسة بشكل عام.

الفصل السادس

الاستنتاجات والتوصيات

Conculusion and Recomendation

الاستنتاجات:

1- بينت نتائج هذه الدراسة أن نسبة انتشار اللشمانيا عند الكلاب في محافظة حماة (7%).

2- تلعب الكلاب دورا مهما في نقل طفيلي اللشمانيا للبشر في محافظة حماة.

3- العينات المصابة بداء اللشمانيا في حماة من نوع L.tropica المسببة للشمانيا الجلدية.

4- ليس للجنس عند الكلاب دوراً في انتشار اللشمانيا حيث لم نجد فروق معنوية في نسب الإصابة بين الذكور والإناث.

5- تلعب الظروف البيئية والمناخية دوراً مهماً في انتشار داء اللشمانيا.

6- تلعب الكلاب السائبة الدور الأكبر في انتشار داء اللشمانيا حيث تشكل خطرا أكبر من الكلاب المنزلية لأنها على تماس بدرجة أكبر مع العوامل المساعدة على انتشار اللشمانيا.

7- تعد الكلاب مستعدة للإصابة سواء كانت بالغة أو غير بالغة على حد سواء حيث لم نجد فروق معنوية في نسبة الإصابة من حيث العمر عند الكلاب المصابة بداء اللشمانيا.

8- تعد مدينة حماة بشكل عام تحت خطر الإصابة بداء اللشمانيا حيث لم نجد فروق معنوية في نسبة الإصابة بين مختلف مناطقها.

التوصيات:

1- تجنب التماس مع الكلاب السائبة قدر الإمكان لما لها من دور مهم نقل الأمراض وخاصة داء اللشمانيا.

2- التخلص وإبعاد مكبات النفايات عن التجمعات السكنية والتخلص من التجمعات المائية الراكدة في الأحياء نتيجة أضرار الصرف الصحي أو الأمطار.

3- الاعتماد على تقنية الPCR في تشخيص داء اللشمانيا لحساسيته العالية ودقة نتائجه وعدم الاكتفاء بالفحوصات اليدوية المجهرية.

4- توسيع إطار البحث والتحقق من دور الحيوانات الأليفة عامة في نقل داء اللشمانيا.

5- محاولة التحقق من دور الكلاب في مختلف محافظات الجمهورية العربية السورية ولا سيما محافظتي درعا واللاذقية التي بدأت تنتشر فيها اللشمانيا الحشوية مع إعطاء ظروف أفضل في البحث لما له من تكاليف وجهد عالية.

﴿الملخص باللغة العربية﴾

أجريت هذه الدراسة للتقصي عن داء اللشمانيا الذي يعد من أخطر ثلاث أمراض في العالم وذلك من خلال الثوي الخازن وهو الكلاب الذي يعد مصدر مهملا للمرض حتى نصل منها لتأمين بداية لخطط مستقبلية لمكافحة اللشمانيا من خلال متابعة طرق انتقالها فقمنا بفحص حالات عشوائية لمجموعة من الكلاب السائبة في محافظة حماة بلغ عددها 43 كلب لمعرفة واقع انتشار المرض في بداية الأمر وذلك من خلال فحص مجهري للطاخة دموية ومن ثم تم الفحص عن طريق جهاز pcr للكشف عن الطفيلي ومن ثم قمنا بتحديد نوع العترة الموجودة في العينات الإيجابية المصابة بالمرض.

وقمنا بعد ذلك بدراسة عدة متغيرات تلعب دورا مهما كعوامل خطورة لانتشار داء اللشمانيا حيث تمت دراسة العينات من حيث متغير العمر ككلاب بالغة او غير بالغة، وتم دراستها أيضا من حيث متغير الجنس (ذكر أو أنثى)، وتمت دراسة متغير المنطقة الجغرافية للمناطق التي تم منها اختيار الكلاب للفحص حيث تم تقسيم العينات حسب المكان في محافظة حماة إلى أربع مناطق (قطاعات) مختلفة كما قمنا بدراسة متغير الزمن على اعتبار فصلي الصيف والشتاء.

أظهرت النتائج: وجود الإصابة بين الكلاب المفحوصة وذلك بنسبة 7% وأظهرت النتائج عدم وجود فوارق معنوية في جنس الكلاب سواء كانت مصابة أو سليمة وكذلك عدم وجود فوارق معنوية في عمر الكلاب المصابة ككلاب بالغة أو فتية ولم نلاحظ أي فوارق معنوية من حيث مكان الإصابة بدارسة المناطق الأربعة المختلفة في المحافظة كما لم نشهد أي فوارق معنوية من حيث الزمن وتأثيره على انتشار داء اللشمانيا في محافظة حماة.

وأشارت الاختبارات أن العترة الموجودة في العينات المصابة (الإيجابية) كانت L.tropica المسببة لداء اللشمانيا الجلدي.

(ABSTRACT)

This study was conducted to investigate leishmaniasis, which is one of the three most dangerous diseases in the world, through the a reservoir which is dogs, which is a neglected source of the disease, in order to secure a start for future plans to combat leishmaniasis by following its transmission methods, so we examined random cases of a group of loose dogs in Hama governorate, numbering 43 dogs, to know the reality of the spread of the disease at the beginning, through a microscopic examination of a blood smear. and then the examination was done by the PCR to detect the parasite, and then we determined the type of cluster present in the positive samples infected with the disease.

We then studied several variables that play an important role as risk factors for the spread of leishmaniasis, where the samples were studied in terms of the age variable as adult or non-adult dogs, and also studied in terms of the sex variable (male or female), and the variable of the geographical area of the areas from which the dogs were selected for examination, where the samples were divided according to location in Hama Governorate into four different areas (sectors), and we also studied the time variable considering the summer and winter seasons.

The results showed: 7% of the examined dogs were found to be infected The results showed that there were no significant differences in the sex of the dogs, whether infected or healthy, as well as no significant differences in the age of the infected dogs as adults or puppies, and we did not observe any significant differences in terms of the place of infection by studying the four different regions in the governorate, as we did not observe any significant differences in terms of time and its impact on the spread of leishmaniasis in Hama governorate.

Tests indicated that the isolate found in the infected (positive) samples was L. tropica, which causes cutaneous leishmaniasis.

المراجع

المراجع العربية:

1- **الحساني، فوزي (1994):** علم الطفيليات، الجزء العملي، الطبعة الثانية.

2- **الحساني، محمد كامل كريم (2012):** دراسة وبائية وتشخيصية مظهرية وجزيئية لداء اللشمانيا الجلدية ونواقلها الحشرية في قضاء الحمزة الشرفي في محافظة القادسية، رسالة ماجستير، كلية التربية–قسم علوم الحياة، جاممعة القادسية– العراق.

3- الحنبظلي، أسامة **محمد ديب (2018):** الرصد الوبائي لداء اللشمانيا في محافظة حماة، رسالة ماجستير، كلية الطب البيطري، جامعة حماة–سوريا.

4- **الموسوي، ازدهار موسى جعفر (2006):** دراسة جزيئية ومناعية لطفيلي اللشمانيا في المحافظات الوسطى والجنوبية، رسالة دكتوراه، كلية التربية –قسم علوم الحياة، جامعة كربلاء – العراق.

5- **العبيدي، وسن أمجد (2019):** التشخيص المصلي لداء اللشمانيا في الكلاب باستخدام اختبار الممتز المناعي المرتبط بالإنزيم في محافظة نينوى، المجلة العراقية للعلوم البيطرية، المجلد 33، العدد2، صفحة 111–114.

6- جوهر، ضياء محمد طاهر (2012): انتشار وتوزع أضداد داء اللشمانيا الحشوية عند الكلاب في مدينة الموصل، المجلة العراقية للعلوم البيطرية، المجلد 26، العدد2، صفحة 36–67.

7- **دعبول، محمد وائل(2009):** داء اللشمانيات الجلدي في دمشق، المجلة الصحية لشرق المتوسط، منظمة الصحة العالمية، المجلد الخامس عشر، العدد5، صفحة 1084–1097.

8- **عبدالنبي، رافد عبد الواحد ؛ المياح، صبيح هليل وعبدالعزيز، سوزان عبد الجبار (2009):** دراسة وبائية لداء اللشمانيا الإحشائية للكلاب في مدينة بغداد وضواحيها، مجلة جامعة الكوفة لعلوم الحياة، المجلد 1، العدد 3، صفحة 1–9.

9- **وزارة الصحة السورية (2016):** المؤشرات الصحية في سوريا 2015.http://www.moh.gov.sy.

1-**AL-Aubaidi, I. and 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 AlHaitham, University of Baghdad, Baghdad, Iraq.

2-**Alimoradi, S.; Hajjaran, H.; Mohebali, M.; and Mansouri, F. (2009)**: Molecular identification of leishmania species isolated from human cutaneous leishmaniasis by RAPD-PCR, Iranian J Publ Health., 38(2): 44-50.

3-**Al–Taee, O. (2008).** Using of PCR in Comparison with other tests in the Diagnosis of pulmonary TB Associated with mycotic infections. MSc. Thesis, College of Medicine. University of Kufa.

4-**Alvar, J.; Canavate, C.; Molina, R.; Moreno, J. and Nieto, J. (2004)**: Canine leishmaniasis. Adv. Parasitol. 57, 1–88.

5- **Andrade, H.; Reis, A, B.; Dos Santos, S.; Volpini, A.; Marques, M. and Romanha, A. (2006)**: Use of PCR–RFLP to identify Leishmania species in naturally-infected dogs, Veterinary Parasitology, Volume 140, Issues 3–4, Pages 231-238.

6-**Arevalo, I.; Ward, B.; Miller, R.; Meng, T.C.; Najar, E. and Alvarez, E. (2001).** Successful treatment of drug-resistant cutaneous leishmaniasis in humans by use of imiquimod, an immunomodulator. Clin Infect Dis 33:1847–1851.

7-**Ashford, R.W. (1996)**: Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. Clin. Dermatol. 14, 523–532.

8-**Ashford, R.W. (2000)**: The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. Int. J. Parasitol. 30, 1269–1281

9-**Asilian, A.; Sadeghinia, A.; Faghihi, G.; Momeni, A. and Amini Harandi, A. (2003)**: The efficacy of treatment with intralesional meglumine antimoniate alone, compared with that of cryotherapy combined with the

meglumine antimoniate or intralesional sodium stibogluconate, in the treatment of cutaneous leishmaniasis. Ann Trop Med Parasitol 97:493–498.

10-**Ates, S.C.; Bagirova, M.; Allahverdiyev Adil, M.; Kocazeybek. B. and Kosan, Erdogan.** (2013): Utility of the microculture method for *Leishmania* detection in non-invasive samples obtained from a blood bank. Acta. *Tropica*., 128:54-60.

11-**Barratt, G. and Legrand, P.** (2005). Comparison of the efficacy and pharmacology of formulations of amphotericin B used in treatment of leishmaniasis. Curr Opin Infect Dis 18:527–530.

12-**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.

13-**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.

14-**Casadevall, A. and 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.

15-**Centers for Disease Control and Prevention (CDC). December 12, 2011**. Parasites, Leishmaniasis. From http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/gen.

16-**Chappuis, F.; Rijal, S.; Soto, A.; Menten, J. and Boelaert, M.** (2006): A metaanalysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. Cite this article as: BMJ, doi:10.1136

17-**Chaudhuri, G. and Chang, K.P. (1988):** Acid protease activity of a major surface membrane glycoprotein (gp63) from Leishmania Mexicana promastigotes. Mol. Bioch. Parasitol., 27:43-52.

18-**Chulay, D.J. (1991):** Leishmaniasis in "Hunters tropical medicine 7th ed"; Ed. Strickland GT, and Hunters G; Pub. Saunders, 638-55.

19-**Cooper, G.; Amos, W.; Bellamy, R.; Siddiqui, M.R.; Frodsham, A.; Hill, A.V. and Rubinsztein, D.C. (1999):** An empirical exploration of the (deltamu)2 genetic distance for 213 human microsatellite markers, Am J Hum Genet., 65(4):1125-33.

20-**Davami, M. H.; Motazedian, M. H. and 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.

21- **Dantas-Torres, F. (2006a):** Leishmania infantum versus Leishmania chagasi: do not forget the law of priority. Mem. nst. Oswaldo Cruz 101,117.

22- **Dantas-Torres, F. (2006b):** Leishmune vaccine: the newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniosis and its potential as a transmission-blocking vaccine.Vet Parasitol. 141, 1-8

23- **Dantas-Torres, F. (2006c):** Presence of Leishmania amastigotes in peritoneal fluid of a dog with leishmaniasis from Alagoas, northeastern Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 48, 219–221.

24- **Dantas-Torres, F. and Branda˜o-Filho, S.P. (2006):** Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 48, 151–156.

25- **Dantas-Torres, F. (2007):** The role of dogs as reservoirs of Leishmania parasites, with emphasis on Leishmania (Leishmania) infantum and Leishmania (Viannia) braziliensis. Veterinary parasitology, 149(3-4),139–146.

26- **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.

27- **Desjeux, P. (2004)**: Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 27, 305–318.

28- **Dib, C.; Faure, S.; Fizames, C.; Samson, D.; Drouot, N.; Vignal, A.; Millasseau, P.; Marc, S.; Hazan, J.; Seboun, E.; Lathrop, M.; Gyapay, G.; Morissette, J. and Weissenbach, J. A. (1996)**: comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites, Nature., 380 (6570): 152–4.

29- **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.

30- **Elamin, E.M.; Guerbouj, S.; Musa, A.M.; Guizani, I.; Khalil, E.A.G.; Mukhtar, M.M.; Elkadaro, A.M.Y.; Mohamed, H.S.; Ibrahim, M.E.; Abdel Hamid, M.M.; El Azhari, M. and El Hassan, A.M. (2005)**: Uncommon clinical presentations of cutaneous leishmaniasis in Sudan, Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, Nov, Pages 803–808,

31- **Esfandiarpour, I. and Dabiri, SH. (2007)**: Treatment of cutaneous leishmaniasis recidivans with a combination of allopurinol and meglumine antimoniate: a clinical and histologic study. Int J Dermatol 46:848–852.

32- **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.

33- **Gallego Solano, L.A.; Koutinas, B.G.; Miro, L.; Cardoso, d.M.G.; Pennisie, L.; Ferrer, f.P.; Bourdeaug, G.; Oliva, h. and Banethi, G. (2009)**: Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. Journal Veterinary Parasitology.Dis: 18(18) 1-7pp.

34- **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.

35- **Gradoni, L. and Gramiccia, M. (2008)**: Leishmaniosis in "Oie terrestrial manual"; Office of International Education.

36- **Gramiccia, M. and Gradoni, L. (2005)**: The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. Int. J. Parasitol. 35, 1169–1180.

37- **Gomes, A.H.; Ferreira, I.M.; Lima, M.L.; Cunha, E.A.; Garcia, A.S.; Arau´jo, M.F. and Pereira-Chioccola, V.L. (2007)**: PCR identification of Leishmania in diagnosis and control of canine leishmaniasis. Vet. Parasitol. 144, 234–241.

38- **Hartzell, J.D.; Aronson, N.E.; Weina, P.J.; Howard, R.S.; Yadava, A. and Wortmann, G.W. (2008)**: Positive rK39 serologic assay results servicemen with cutaneous leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg.79(6):843-6.

39- **Harris, E.; Kropp, G.; Belli, A.; Rodriguez, B. and Agabian, N. (1998)**: Singlestep multiplex PCR assay for characterization of new world leishmania complexes, J Clin Microbiol., 36(7): 1989-95.

40- **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.

41- **Hellier, I.; Dereure, O.; Tournillac, I.; Pratlong, F.; Guillot, B. and Dedet, J.P. (2000)**: Treatment of Old World cutaneous leishmaniasis by pentamidine isethionate. An open study of 11 patients. Dermatology 200:120–123

42- **Hervas, J.A.; Martin-Santiago, A.; Hervas, D.; Rojo, E.; Mena, A. and Rocamora, V. (2012):** Old world Leishmania infantum cutaneous leishmaniasis unresponsive to liposomal amphotericin B treated with topical imiquimod. Pediatr Infect Dis J 31:97-100.

43- **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.

44- **Idrissi, H.; Hakkour, M.; Duchateau, L.; Zanatta, R.; Kachani, M.; Azrib, R.; Daminet, S.; Kichou, F.; El Asatey, S.; Tazi, N.; Sahibi, H. and El Hamiani Khatat, S. (2021):** Canine Leishmaniasis in Morocco: A Descriptive Prospective Clinical Study. Veterinary medicine international, 2021, 6304127.

45- **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.

46- **Kalter, D.C. (1994):** Laboratary tests for the diagnosis and evaluation of leishmaniasis, Dermatol Clin., 12(1): 37-50.

47- **Kaneria, M.V.; Jagtap, S.; Modi, C. and Kamath, S. (2005):** A typical presentation of visceral leishmaniasis, JAPI., 53: 573-5.

48- **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.

49- **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.

50- **Klaus, S.N.; Frankenburg, S. and Ingber, A. (1999):** Epidemiology of cutaneous leishmaniasis, Clin Dermatol., 17 (3): 257 - 260.

51- **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.

52- **Knapik, E.W.; Goodman, A.; Ekker, M.; Chevrette, M.; Delgado, J.; Neuhauss, S.; Shimoda, N.; Driever, W.; Fishman, M.C. and Jacob, H,J. (1998)**: A microsatellite genetic linkage map for zebrafish (Danio rerio), Nat Genet., 18(4): 338-43.

53- **Kumar, R.; Bumb, R.; Nasim, A. and Rajesh, D. (2007)**: Cutaneous leishmaniasis caused by leishmania tropica in BIKANER, INDIA: Parasite identification and characterization using molecular and immunologic tools, Am J Trop Med Hyg., 76(5): 896–901.

54- **Lachand, L.; Chabbert, E. and Pastten, P. (2000)**: Comparison of virus sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using preferial blood. J. Clin. Microbiol., 4: 613 – 617.

55- Leishmania coinfection: a review of 91 cases with focus on atypical locations of Leishmania. Clin. Infect. Dis., 31(4): 1093-1095.

56- **Llanos-Cuentas, E.A.; Roncal, N.; Villaseca, P.; Paz, L.; Ogusuku, E.; Pérez, J.E.; Cáceres, A.and Davies, C.R. (1999)**: Natural infections of *Leishmania peruviana* in animals in the Peruvian Andes, *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Volume 93, Issue 1, January-February 1999, Pages 15–2.

57- **Marouf, M. (2006)**: Distribution of cutaneous leishmaniasis in Damascus and its suburbs during 2002-2005, Arab Journal of Pharmaceutical Sciences., 3(3): 39-51

58- **Mathis, A. and Deplazes, P. (1995)**: PCR and in Vitro Cultivation for detection of Leishmania species in diagnostic samples from human and dogs. J. Clin. Microbiol. 33: 1145-11949.

59- **Mchugh, C.P.; Melby, P.C. and LaFon, S.G. (1996)**: Leishmaniasis in Texas: epidemiology and clinical aspects of human cases. Am J Trop Med Hyg. 55(5):547-55.

60- **Meredith, S.; Zijlstra, E. and Lawyer, P. (1993)**: Development and application of the polymerase chain reaction for the detection and identification of leishmania parasites in clinical material. Arch. Ins. Pasteur Tunis, 70: 419- 431.

61- **Millán, J., Zanet, S., Gomis, M., Trisciuoglio, A., Negre, N., & Ferroglio, E. (2011)**: An investigation into alternative reservoirs of canine leishmaniasis on the endemic island of Mallorca (Spain). Transboundary and emerging diseases, 58(4), 352–357.

62- **Moreno, J. and Alvar, J. (2002)**: Canine leishmaniasis epidemiological risk and the experimental model. Trends Parasitol. 18, 399–405.

63- **Mo'awia, M.; Hassan, Omran, F.; Osman, Fathi, M.A.; El-Raba'a, H.D.; Schallig, F.H. and Dia-Eldin A.E. (2009)**: Role of the domestic dog as a reservoir host of Leishmania donovani in eastern Sudan, Parasites Vectors 2,26 (2009). https://doi.org/10.1186/1756-3305-2-26

64- **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.

65- **Mullis, K.; Saiki, R.; Scharf, S.; Faloona, F.; Horn, G.; Erlich, H. and Arnheim, N. (1985)**: "**Enzymatic** amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia". Science; 230 (4732): 1350–1354.

66- **Navin, T.R.; Arana, F.E.; de Mérida, A.M,; Arana, B.A.; Castillo, A.L. and Silvers, D.N. (1990)**: cutaneous leishmaniasis in Guatemala: comparison of diagnostic methods, Am J Trop Med Hyg., 42 (1): 36-55.

67- **Navin, T.R.; Arana, B.A.; Arana, F.E.; Berman, J.D. and Chajon, J.F. (1992)**: Placebocontrolled clinical trial of sodium stibogluconate (Pentostam) versus ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. J Infect Dis. 165(3):528-34.

68- **Negera, E.; Gadisa, E.; Hussein, J.; Engers, H.; Kuru, T. and Gedamu, L. (2012)**: Treatment response of cutaneous leishmaniasis due to Leishmania aethiopica to cryotherapy and generic sodium stibogluconate from patients in Silti, Ethiopia. Trans R Soc Trop Med Hyg 106:496–503.

69- **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.

70- **Paniz Mondolfi, A.E.; Stavropoulos, C.; Gelanew, T.; Loucas, E.; Perez Alvarez, A.M. and Benaim, G. (2011)**: Successful treatment of Old World cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania infantum with posaconazole. Antimicrob Agents Chemother 55:1774–1776

71- **Postigo, J.A. (2010)**: Leishmaniasis in the World Health Organization Eastern Mediterranean region, Int J Antimicrob Agents. 36S: S62–5.

72- **Pratlong, F.; Rioux, J.A.; Marty, P.; Faraut-Gambarelli, F.; Dereure, J.; Lanotte, G. and Dedet, J.P. (2004)**: Isoenzymatic analysis of 712 strains of Leishmania infantum in the south of France and relationship of enzymatic polymorphism to clinical and epidemiological features. J. Clin. Microbiol. 42, 4077–4082.

73- **Pratlong, F.; Dedet, J,P.; Marty, P.; Portús, M.; Deniau, M.; Dereure, J.; Abranches, P.; Reynes, J.; Martini, A. and Lefebvre, M. (1995)**: Leishmania-HIV coinfection in the Mediterranean basin: isoenzymatic characterization of 100 isolates of the Leishmania infantum Complex, J infect Dis., 172(1): 323-6.

74- **Peters, N.C. (2008)**: In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*, 321(December), pp.970–975.

75- **Pelt-Verkuil, E.V.; Belkum, A.V. and Hays, J.P. (2008)**: Analysis of PCR amplification products in "Principles and Technical Aspects of PCR

Amplification"; Ed. Pelt-Verkuil EV, Belkum AV, and Hays JP; Pub. Springer, 141-82.

76- **Reithinger, R. and Dujardin, J. (2007):** Molecular diagnosis of leishmaniasis: Current status and future applications, J Clin Microbiol., 45(1): 21- 5.

77- **Reithinger, R.; Dujardin, J.C.; Louzir, H.; Pirmez, C.; Alexander, B. and Brooker, S. (2007):** Cutaneous leishmaniasis, Lancet Infect Dis., 7(9): 581–96.

78- **Rebollar-Tellez, E.A.; Tun-Ku, E.; Manrique-Saide, P.C. and NdradeNarvaez, 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

79- **Ritting, M. and Bogdan, C. (2000):** Leishmania-host-cellinteraction complexities and alternative view. parasitology today, 16 (7):292-297.

80- **Ridley, D.S. (2004):** The pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., (73): 150-160.

81- **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.

82- **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.

83- **Rodriguez, N.; Guzman, B.; Rodas, A.; Takiff, H.; Bloom, B.R. and Convit, J. (1994):** Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization, J Clin Microbiol., 32(9): 2246-52.

84- **Rosypal, A. C.; Hailemariam, S.; Wekheye, V.; Huong, L. T. T.; Dubey, J. P.; Lindsay, D. S. and Tidwell, R. R. (2009)**: Survey of dogs from Vietnam for antibodies to visceralizing Leishmania spp. Journal of Parasitology, 95(3), 767-767.

85- **Saliba, E.K. and Oumeish Y.O. (1999)**: Reservoir hosts of cutaneous leishmaniasis. Clin. Dermatol. 17, 275–277.

86- **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.

87- **Salotra, P.; Sreenivas, G.; Pogue, G.P.; Lee, N.; Nakhasi, H.L.; Ramesh, V. and Negi, N.S. (2001)**: Development of a species-specific PCR assay for detection of leishmania donovani in clinical samples from patients with kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis, J Clin Microbiol., 39(3): 849-54

88- **Santaella, J.; Ocampo, C. B.; Saravia, N. G.; Méndez, F.; Góngora, R.; Gomez, M. A. and Quinnell, R. J. (2011)**: Leishmania (Viannia) infection in the domestic dog in Chaparral, Colombia. The American journal of tropical medicine and hygiene, 84(5), 674.

89- **Schuster, F.L. and Sullivan, J.J. (2002)**: Cultivation of clinically significant hemoflagellates, Clin Microbiol Rev., 15(3): 374–89.

90- **Schallig, H.D. and Oskam, L. (2002)**: Molecular biological application in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification, Trop Med Int Health., 7(8): 641-51.

91- **Segura, G. B. R.; Ochoa, W. H. S.; Matta, V. L. R. D.; Martínez, M.; Tercero, C. R.; Gonzalez, R. R.; Pacheco, C. M. S.; Flores, G. V. A.; Silveira, F. T.; Henriquez, M. M. R. and Laurenti, M. D. (2023)**: Can domestic dogs be considered a good reservoir of Leishmania (L.) infantum chagasi in an endemic area of nonulcerated cutaneous leishmaniasis in

Southern Honduras?. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, 65, e24.

92- **Shiraz, J. and Syed, M. (2007)**: Cutaneous leishmaniasis in Pakistan. Gomal Medical College. Dermatology Online Journal, 11(1): 4 -9.

93- **Singh, S. (2006)**: New developments in diagnosis of leishmaniasis, Indian J Med Res., 123(3): 311-30.

94- **Singh, S. (2003)**: Recent Advances in the Diagnosis of Leishmaniasis. Journal of Postgraduate Medicine 49(1):p 55-60, Jan–Mar 2003. | DOI: 10.4103/0022-3859.927

95- **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.

96- **Solano-Gallego, L.; Llull, J.; Ramos, G.; Riera, C.; Arboix, M.; Alberola, J. and Ferrer, L. (2000)**: The Ibizian hound presents a predominantly cellular immune response against natural Leishmania infection. Vet. Parasitol. 90, 37–45.

97- **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.

98- **Tashakori, M.; Ajdary, S.; Kariminia, A.; Mahboudi, F. and Alimohammadian, M.H. (2003)**: Characterization of leishmania species and L. major strains in different endemic areas of cutaneous leishmaniasis in Iran, Iranian Biomedical Journal. 2003; 7 (2): 43-50.

99- **Tayeh, A.; Jalook, L. and Caincross, S. (1997)**: Twenty years of cutaneous lishmaniasis in Aleppo, Syria, Trans Roy Soc Trop Med Hyg., 91(6): 657- 9.

100-**Tojal da Silva, A.C.; Cupolillo, E.; Volpini, A.C.; Almeida, R. and Romero, G.A. (2006)**: Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in RioBranco, state of Acre, Brazil, Trop Med Int Health., 11(9): 1388- 98.

101-**University of Glasgow, (2008)**: Protocols for handling and working with leishmania species, Mottram laboratory.

102-**Van Eys, J. E.; Mathius, I. W.; Pongsapan, P. and Johnson, W.L. (1985)**: Foliage of tropical legume trees as low-level supplement to napier grass diets for growing goats. J. Anim. Sci., 61 (Suppl. 1): 331-332

103-**Van Eys, G.J.; Schoone, G.J.; Ligthart, G.S.; Alvar, J.; Evans, D.A. and Terpstra, W.J. (1989)**: Identification of Old World Leishmania by DNA recombinant probes, Mol Biochem Parasitol., 34(1): 53–62.

104-**Van Eys, G.J.; Guizani, I.; Ligthart, G.S. and Dellagi, K. (1991)**: A nuclear DNA probe for the identification of strains within the Leishmania donovani complex, Exp Parasitol. 1991; 72(4): 459–63.

105-**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.

106-**Vidyashankar, C. and Agrewal, R. (2007)**: Pediatric emedicine Leishmaniasis. Specialties pediatrics: General parasitology.

107-**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

108-**World Health Organization, leishmaniasis (1994)**: culture of leishmania from aspirate or biopsy semples, WHO press,

109-**World Health Organization WHO. (2011c)**: World Health Organization, Technical Report Series, 701:2-4. Expert committee (1984) epidemiological aspects.

110-**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)

111-**World Health Organization WHO. (2008):** Leishmaniasis: cutaneous leishmaniasis reports. Consultative meeting on cutaneous Leshmaniasis. WHO Headquarters, from 30 April to 2 May 2007 WHO/HTM/NTD/IDM. Leishmaniasis Control Programme, Geneva. www.WHO.org.

112-**Wortmann, G.; Miller, R.S.; Oster, C.; Jackson, J. and Aronson, N. (2012):** Arandomized, double-blind study of the efficacy of a 10- or 20-day course of sodium stibogluconate for treatment of cutaneous leishmaniasis in United States military personnel. Clin Infect Dis. 2012 Aug 1. 35(3):261-7.