Typing of Leishmania Species Responsible of Cutaneous Lesions in the Syrian Coast

Dr. Mohamad Ismaiel*
Dr. Haissam Yazigi**
Dr. Jamal Khaddam***
Ayham Alnukari****

(Received 17 / 8 / 2020. Accepted 16 / 9 / 2020)

□ ABSTRACT □

In this research, we studied the cases of cutaneous leishmaniasis that went to the Department of Dermatology at Tishreen University Hospital in Lattakia and the Specialized Centers for Leishmania and Parasitic Diseases in Lattakia and Tartous Governorates from the beginning of April 2018 until the end of April 2020.
Where leishmaniasis spreads in eighty-eight countries of the world, including the Syrian Arab Republic, and this disease caused by a single-cell parasite of the genus Leishmania, and about twenty-two human pathogen belongs to this genus. Three clinical forms of this disease are known: cutaneous leishmaniasis, mucocutaneous leishmaniasis, and visceral leishmaniasis. A set of diagnostic methods and identification of the parasite type have been developed with the aim of administering the appropriate treatment and guiding ways to prevent infection, including isoanzyme analysis, immunological serological methods and DNA hybridization techniques. The technique of polymerase chain reaction (PCR), which depends on either genomic DNA or kinetoplast DNA, is one of the most important molecular methods currently adopted in diagnosing this disease and knowing the type of parasite causing the most accurate. In this work, we isolated DNA from samples taken from individuals with cutaneous leishmaniasis and fixed on glass slides for direct microscopy. The kinetoplasty DNA was used to determine the parasite type using PCR technique. And by the presence of specific projects that inflate fragments of different lengths characteristic of the parasite type. It was found that all the studied samples were L. tropica.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis, PCR, Kinetoplast DNA, Diagnosis, l.tropica.

* **Professor - Department of Dermatology and Venereology, Faculty of Medicine, Tishreen University, Syria.**
** **Professor - Department of Laboratory Diagnosis, Faculty of Medicine, Tishreen University, Syria.**
*** **Associate Professor - Department of Dermatology and Venereology, Faculty of Medicine, Tishreen University, Syria.**
**** **Postgraduate Student (PhD) - Department of Dermatology and Venereology, Faculty of Medicine, Tishreen University, Syria.**

تنميط أنواع الليشمانيا المسؤولة عن الإصابات الجلدية في الساحل السوري

د. محمد عادل اسماعيل*
د. هيثم يازجي**
د. جمال خدام***
أيهم النقري****

(تاريخ الإيداع 17 / 8 / 2020. قُبِل للنشر في 16 / 9 / 2020)

□ ملخّص □

قمنا في هذا البحث بدراسة حالات الليشمانيا الجلدية التي راجعت قسم الأمراض الجلدية في مشفى تشرين الجامعي باللاذقية والمراكز التخصصية لليشمانيا والأمراض الطفيلية في محافظتي اللاذقية وطرطوس من بداية شهر نيسان 2018 حتى نهاية شهر نيسان 2020.

حيث ينتشر داء الليشمانيا في ثمانٍ وثمانين دولة من دول العالم ومنها الجمهورية العربية السورية، ويسبب هذا الداء طفيلي وحيد خلية من جنس الليشمانيا، وينتمي لهذا الجنس حوالي اثنين وعشرين نوعاً ممرضاً للإنسان. يعرف لهذا الداء ثلاثة أشكال سريرية هي الليشمانيا الجلدية والليشمانيا الجلدية المخاطية والليشمانيا الحشوية. وقد طُورت مجموعة من طرائق التشخيص وتحديد نوع الطفيلي بهدف إعطاء العلاج المناسب وتوجيه طرق الوقاية من الإصابة، تتضمن التحليل الايزوانزيمي والطرائق المصلية المناعية وتقانات تهجين DNA. وتعتبر تقنية التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR التي تعتمد إما على DNA الجينومي أو DNA الكينيتوبلاستي من أهم الطرائق الجزيئية المعتمدة حالياً في تشخيص هذا الداء ومعرفة نوع الطفيلي المسبب وأدقها. قمنا في هذا العمل باستفراد DNA من عينات مأخوذة من أفراد مصابين بداء الليشمانيا الجلدية ومثبتة على شرائح زجاجية تستخدم في الفحص المجهري المباشر. وإستخدم DNA الكينيتوبلاستي لتحديد نوع الطفيلي باستخدام تقنية PCR؛ وذلك بوجود مشارع نوعية تضخم شدفاً ذات أطوال مختلفة مميزة لنوع الطفيلي. وقد تبين أن جميع العينات المدروسة هي من نوع الليشمانيا المدارية L. tropica.

الكلمات المفتاحية: داء الليشمانيا الجلدية، التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR، DNA الكينيتوبلاستي، التشخيص، الليشمانيا المدارية.

* **أستاذ – كلية الطب البشري – قسم الأمراض الجلدية والمنقولة بالجنس – جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.**
** **أستاذ – كلية الطب البشري – قسم الطب المخبري – جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.**
*** **أستاذ مساعد – كلية الطب البشري – قسم الأمراض الجلدية – جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.**
**** **طالب دراسات عليا (دكتوراه) – كلية الطب البشري – قسم الأمراض الجلدية والزهرية – جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.**

مقدمة:

يعرف داء اللشمانيات منذ قدم التاريخ بأنواعه الجلدي والجلدي المخاطي والحشوي ولقد وجد وصف له في العالم القديم منذ القرن الأول الميلادي. ويعد حالياً أحد أهم الأمراض الطفيلية المنتشرة على مستوى العالم، نظراً لانتشاره في أربع قارات (آسيا، إفريقيا، أوروبا، أمريكا) واستيطانه في 88 بلداً، ويقدر عدد الإصابات به في كل عام بحوالي مليوني إصابة، كما يقدر عدد المعرضين لخطر الإصابة بحوالي 350 مليون شخصاً نظراً لوجودهم في أماكن انتشار الداء. تسجل أكثر من 90% من حالات الليشمانيا الحشوية في العالم في بنغلادش، والبرازيل، والهند، والسودان. بينما 90% من حالات اللشمانيا الجلدية أُحصيت في أفغانستان، البرازيل، إيران، المملكة العربية السعودية، الجمهورية العربية السورية، اليمن. في حين ينتشر الداء الجلدي المخاطي في مناطق محدودة من العالم كالبرازيل. وذلك بحسب إحصائيات منظمة الصحة العالمية (1).

عرف داء الليشمانيا الجلدي في سورية في حلب منذ عام 1745 عن طريق Bocok (2)، ويعرف الداء باسم حبة حلب أو حبة السنة. وقد كانت الإصابات حتى ما قبل عام 1960 محصورة في مدينة حلب وضواحيها وأماكن متفرقة من وادي الفرات. حدثت بعد ذلك العام عدة جائحات محلية شملت أغلب محافظات القطر العربي السوري وتوطنت في الضمير (ريف دمشق)، حيث سجلت زيادة في عدد الإصابات الجلدية من 40 حالة في العام 1987 إلى 2071 حالة عام 1989 (3).

يسبب الداء طفيلي وحيد خلية من جنس الليشمانيا Leishmania، إجباري التطفل داخل خلوي، حيث يتطفل عادة على أنواع البلاعم. ويصنف هذا الجنس من صف السوطياتFlagellate وفصيلة المثقبيات Trypanosomatidae، ويعرف منه حوالي ثلاثين نوعاً ممرضاً للإنسان والثدييات الأخرى، من أهم الأنواع المسببة للداء الجلدي الليشمانيا المدارية L.tropica، والليشمانيا الكبرى L.major، والليشمانيا الاثيوبية L.aetiopica والأنواع المسببة للداء الحشوي الليشمانيا الطفلية L.infantum، والليشمانيا الدونوفانية L. donovani. تُعد أنثى الفاصدة Phlebotomus أو ذبابة الرمل Sand fly الحشرة المسؤولة عن نقل الأنواع المختلفة من طفيلي الليشمانيا إلى الإنسان.

يتكاثر هذا الطفيلي ضمن الفجوات البلعمية داخل البلعميات وحيدة النواة عند الثوي، حيث يكون عديم السوط بيضوياً أو دائري الشكل يعرف Amastigote، بينما يتخذ الطفيلي شكلاً آخر عند وجوده في معي الحشرة الناقلة وهي أنثى ذباب الرمل Phlebotomus، حيث يتطاول الطفيلي ليأخذ شكلاً مغزلياً مزوداً بسوط أمامي يدعى Promastigote، كما نجده في أوساط الزرع الصنعية (4). يسبب داء الليشمانيات في سورية الأنواع الطفيلية التالية:

طفيليات Leishmania tropica التي تسبب داء الليشمانيا الجلدي الجاف فقد تم عزل هذا الطفيلي من مصابين في مدينة حلب (5، 6).

طفيليات Leishmania major المسببة لداء الليشمانيا الجلدي الرطب، والتي تم عزلها من مصابين ومن الخازن اليربوع (Psammomys obesus) من ريف دمشق: الرحيبة والضمير (3، 5، 6).

طفيليات Leishmania infantum التي تسبب داء الليشمانيا الحشوي عند الأطفال.

تم عزل هذه الطفيليات من كلب مصاب في المنطقة الساحلية (7).

تشخص عادة الإصابة بداء الليشمانيات الجلدي عن طريق الفحص المجهري المباشر لعينة ترفع من مكان الإصابة وتلون بملون غيمزا Giemsa. تبين أن حوالي 40% من الحالات السلبية بالفحص المجهري كانت إيجابية عند

استخدام طرق أخرى، مما يعكس الحساسية المنخفضة لهذه الطريقة في كشف الطفيلي (8). كما أن الفحص المجهري المباشر لا يسمح بتحديد نوع الطفيلي. بالمقابل، تتطلب معظم الطرق الأخرى مثل الدراسات الكيميائية الحيوية والمناعية والجزيئية استنبات الطفيليات لعدة أسابيع للحصول على كميات كافية. عادة ما تستخدم تقنية الرحلان الكهربائي الإنزيمي عديد المواقعMultilocus enzyme electrophoresis أو ما يعرف بالتحليل الإيزوإنزيمي Isoenzyme analysis لتحديد نوع الطفيلي(10،9). لكن هذا النمط من الاختبارات يتصف بكونه عالي الكلفة، ويحتاج إلى معدات نوعية ويتطلب فترة زمنية طويلة نسبياً. بينما تعد الاختبارات المناعية، المعتمدة على الأضداد وحيدة النسيلة التي تتعرف بشكلٍ نوعي على الأنواع المختلفة للطفيلي، غير دقيقة بسبب التشابه الكبير للمستضدات السطحية بين الأنواع المختلفة للطفيلي مما يؤدي إلى حدوث تفاعلات تصالبية بين الأنواع (12،11).

جرى في السنوات الأخيرة تطوير الكثير من التقنيات الجزيئية التي تعتمد على DNA في تشخيص وتحديد نوع الطفيلي المسبب لداء الليشمانيات، منها استخدام تقنية التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR التي تعتمد على DNA الكينيتوبلاستي (kinetoplasted DNA (kDNA). يعرف DNA الكينيتوبلاستي بهذا الاسم نسبة إلى العضية التي تحويه وهي الكينيتوبلاست kinetoplaste أو صانعة السوط، وهي عضية مميزة لصف السوطيات. تحوي هذه العضية في الليشمانيا نوعين من DNA الحلقي: يعرف الأول بالحلقات الصغيرة Minicircles، حيث لا يتجاوز حجم هذه الحلقات 800 شفعاً من الأسس bp800، ويبلغ عدد نسخ هذا النمط من DNA في الصانعة الواحدة حوالي عشرة آلاف. ويعرف الثاني بالحلقات الكبيرة Maxicircels الذي يتجاوز طوله عدة آلاف من أشفاع الأسس، وتحوي الصانعة الواحدة حوالي خمسين نسخة(13). تتصف الحلقات الصغيرة في كل أنواع جنس الليشمانيا باحتوائها على تسلسلٍ محافظٍ، يتألف من 120 شفعاً من الأسس، يميز جنس الليشمانيا عن باقي السوطيات، أما باقي التسلسل فهو متغاير في طوله بين الأنواع ويمكن الاعتماد على هذا التغاير في تحديد نوع الطفيلي باستخدام تقانة PCR. لذلك استخدمت الحلقات الصغيرة في تشخيص الإصابة بالليشمانيا وتنميط الطفيلي (16،15،14).

أهمية البحث وأهدافه:

لاحظنا في السنوات الأخيرة تزايد عدد الإصابات بالليشمانيا الجلدية بشكل كبير في المحافظات السورية جميعها، مما جعل من داء الليشمانيات مشكلة صحية هامّة تستدعي الدراسة بهدف عزل وتحديد نوع الطفيلي المسؤول عن الإصابات الجلدية في سورية، وذلك من أجل وضع خطّة لمكافحة هذا المرض والحد من انتشاره. وبالرغم من أهمية الفحص المجهري والزرع في تشخيص الليشمانيا الجلدية إلا أن الحساسية المنخفضة لهذه الطرق في كشف الطفيلي. كما أنها لا تسمح بتحديد نوع الطفيلي، مما دفعنا في هذا البحث إلى استخدام تقنية التفاعل السلسلي للبوليميراز **PCR** التي تعتمد على **DNA** الكينيتوبلاستي.

جرى في هذا البحث تشخيص مباشر للإصابة بالليشمانيا الجلدية وتحديد نوع طفيلي المسبب للداء. حيث جرى استفراد DNA مباشرة من اللطاخة بعد دراستها مجهرياً، وجرى الاعتماد على kDNA في تحديد نوع الطفيلي المدروس باستخدام شفع من المشارع تتشافع مع تسلسلات محافظة، وتضخم شدفاً متغايرة الأطوال مميزة لنوع الطفيلي، وتبين بنتيجة هذه الدراسة أن جميع العينات المدروسة هي من نوع الليشمانيا المدارية L.tropica

طرائق البحث ومواده:

الحصول على العينات:

تم أخذ عينات هذه الدراسة من آفات جلدية ل 364 مريض راجعوا قسم الأمراض الجلدية والزهرية في مشفى تشرين الجامعي باللاذقية والمراكز التخصصية لليشمانيا والأمراض الطفيلية في محافظتي اللاذقية وطرطوس وذلك منذ بداية نيسان 2018 حتى نهاية نيسان 2020، وقد تم الحصول على المعلومات الشخصية لكل حالة وتتضمن: عمر المصاب، مكان عمله، مكان إقامته، الأماكن التي زارها المصاب، نمط الإصابة، موضعها، عمرها، قطرها، عددها، كثافة حشرة ذبابة الرمل (العامل الناقل) داخل المنزل وخارجه، 137 (37.64%) حالة من الإناث، و227 (62.36%) حالة من الذكور. وجرى تشخيص الحالات جميعها بالفحص المجهري المباشر عن طريق أخذ عينة من الآفة الجلدية للمرضى، بعد مسحها بالإيثانول 70%، بوساطة مشرط جراحي عقيم ذي استخدامٍ وحيد disposable. وضعت العينة على الصفيحة الزجاجية بشكل لطاخة وتركت لتجف ثم ثبتت بالميثانول لعدة ثواني ولونت بملون غيمزا الممدد 1:5 ضمن دارئة ملحية فسفاتية PBS. غُسلت الصفائح بالماء بعد التلوين وجُففت ثم فحصت مجهرياً.

الفحص المجهري المباشر:

تم فحص العينات المثبتة والملونة باستخدام المجهر الضوئي. على التكبير النهائي ×1000. اعتبرت العينات إيجابية عند العثور على طفيلي واحد على الأقل من الشكل عديم السوط داخل أو خارج البلاعم.

استخلاص DNA:

جرى استخلاص DNA من اللطاخات المثبتة والملونة على الصفائح الزجاجية، باستخدام عتيدة خاصة. فجرى تنظيف الصفائح بشكلٍ جيد بمسحها عدة مرات بالإيثانول المطلق للتخلص من زيت الأرز المستخدم في الفحص المجهري. وضعت كمية (µL180) من الدارئة المهيئة للحل prelysis buffer على اللطاخة وتركت عدة دقائق ثم كُشطت بشكلٍ جيد وسحبت الدارئة بما تحويه من خلايا معلقة إلى أنبوب ايبندورف، ثم أضيف إليها µL25 البروتياز K proteinase K 20mg/ µL. حُضن المزيج لمدة ساعة في درجة حرارة C°56، ثم أضيف µL200 من دارئة الحل، حضن بعدها المزيج لمدة 10 دقائق في درجة حرارة C° 70، ليفصل بعدها DNA باستخدام أعمدة كروماتوغرافيا بلاستكية صغيرة NucleoSpin column تحوي على طور ثابت من السيليكا الأليف للحموض النووية. يُمرر المزيج الحاوي على DNA بعد إضافة µL210 من الإيثانول المطلق ويتم التخلص من السائل بعملية التنبيذ لمدة دقيقة واحدة بسرعة دوران قدرها g11000. يُغسل بعدها العمود عدة مرات بدارئة غسل Washing buffer، ثم يجفف ويشطف DNA باستخدام µL50 من دارئة الشطف Elution buffer. يحفظ بعدها DNA في درجة حرارة – C° 20 إلى وقت الاستخدام.

مقايسة DNA:

تم تعيين تركيز DNA المستفرد بقياس الامتصاصية الضوئية للعينات جميعها باستخدام مقياس الطيف الضوئي Spectrophotometer T70 LTD PG، في موجة طولها nm260. استخدم الماء المقطر لضبط قيمة صفر الجهاز، وقُرئت قيم الامتصاص لحجوم ممددة خمسين مرة لعينات DNA المختلفة.

التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR:

أُنجز تفاعل PCR على حوالي 50ng من DNA المستفرد في حجم نهائي قدره 30µL يحوي على دارئة خاصة بالإنزيم بتركيز X1 و1.5mM من MgCl2 و0.2mM من كل نكليوتيد ثلاثي فسفات منزوع الأكسجين dNTPs و25pmol من كل مشرع Primer و1.25U من GoTaq بوليميراز (Promega).

استخدم شفع من المشارع (CSB1xR (ATTTTTCGCGATTTTCGCAGAACG، و CSB1xF (CGAGTAGCAGAAACTCCCGTTCA) المحضرة من قبل شركة Alpha DNA الكندية.

أنجزت التفاعلات باستخدام جهاز (PCR PeQlab). وجرت برمجته لينجز 40 دورة تتألف كل منها من ثلاث مراحل مدة كل مرحلة 30 ثانية. جرى التسخين في المرحلة الأولى إلى الدرجة 95°C لفك ارتباط طاقي DNA، وفي الثانية إلى الدرجة 54µC لكي ترتبط المشارع بشكل نوعي مع DNA، وفي الثالثة إلى الدرجة 72 C لكي يقوم الإنزيم DNA Polymerase بعملية الإطالة.

الرحلان الكهربائي:

حُللت نتائج PCR بتقنية الرحلان الكهربائي الأفقي على هلامة أغاروز (Promega) بتركيز 1%، حضرت باستخدام دارئة الرحلان TBE. جرى صب الهلامة في قوالب خاصة بجهاز الرحلان (PeQlab)، وأضيف الاتيديوم برومايد بتركيز نهائي قدره 0.5µg/ml. مزج 10µL من ناتج التفاعل مع 2µL من دارئة تحميل العينة Loading Buffer بتركيز (Sigma6 X)، ورحلت العينات وواصمات الأطوال المعيارية (Promega) بتطبيق تيار كهربائي قدره 100 فولت لمدة 30 دقيقة. وكشفت أَشْرِطَة الـ DNA باستخدام منبع أشعة فوق بنفسجية قصيرة الموجة (Cleaver)، ووثقت الهلامة باستخدام جهاز موثق الهلام Gel documentation (Cleaver) مزود بآلة تصوير رقمية تحوي مرشحة خاصة بالأشعة فوق البنفسجية.

النتائج Results:

تناولت هذه الدراسه 364 حالة، لمرضى مصابين بداء الليشمانيا الجلدية مراجعين لقسم الأمراض الجلدية والزهرية في مشفى تشرين الجامعي باللاذقية والمراكز التخصصية لليشمانيا والأمراض الطفيلية في محافظتي اللاذقية وطرطوس وذلك منذ بداية نيسان 2018 حتى نهاية نيسان 2020. جرى تشخيص جميع الحالات جميعها بالفحص المجهري المباشر والزرع، الذي بين أن كل الحالات المدروسة إيجابية وظهرت فيها الطفيليات عديمة السوط داخل وخارج البلاعم، كما تظهر اللطاخات في الشكل 1.

استفراد الـ DNA الكلي من الشرائح الملونة بملون غيمزا:

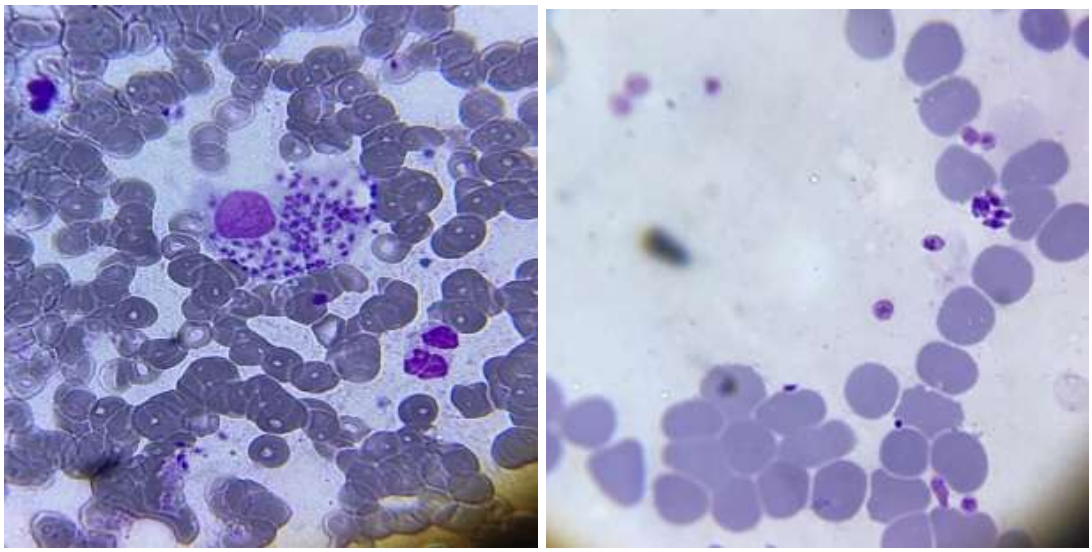
تم عزل الـ DNA من اللطاخة المثبتة على الصفائح الزجاجية باستخدام عتيدة خاصة كما ذكر في الطرق. وذلك بهدف تنميط الطفيلي. أظهرت معايرة الـDNA المعزول من كافة العينات بقراءة الامتصاصية الضوئية لكل عينة أن كمية DNA كانت وسطياً بحدود 100ng.

تحديد نوع الطفيلي بتقنية PCR:

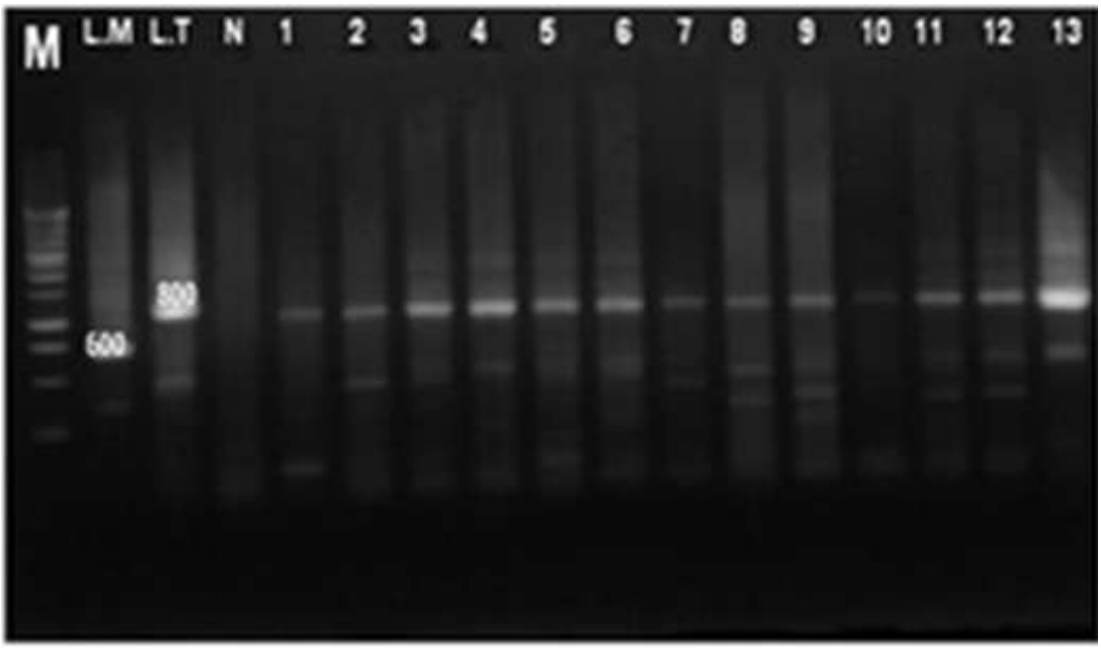
استخدمنا تقنية PCR لتحديد نوع الطفيلي المسبب لداء الليشمانيات الجلدي، جرى انتقاء شفع من المَشارِع CSB2XF/CSB1XR الخاصة بتسلسلات محددة ومحافظة من kDNA في عدد كبير من أنواع الليشمانيا تحصر بينها تسلسلاً متغايراً في طوله حسب النوع. وبتضخيم DNA المحصور بين هذه المَشارِع، نحصل على شدفة بطول

Print ISSN: 2079-309X, Online ISSN: 2663-4287

600 شفعاً تقريباً من الأسس في النوع L.major وحوالي 800 شفعاً من الأسس في النوع L.tropica و680 شفعاً من الأسس في النوع L.infantum. استخدمنا في هذه الدراسة تفاعل PCR على DNA المعزول من العينات جميعها، ومن سلالتين مرجعيتين من L.tropica وIRD) L.major) استخدمت كشاهد إيجابي، واستخدم شاهد سلبي يتألف من مكونات تفاعل PCR جميعها باستثناء DNA. رُحلت نواتج تفاعل PCR على هلامة أغاروز تركيزها 1% (الشكل 2)، فأظهرت السلالات المدروسة شريطاً بطول 800 شفعاً من الأسس، وبمقارنة طول هذه الشدفة مع أطوال الشدف المميزة للسلالات المرجعية، استنتجنا أن العينات جميعها (364 عينة) تنتمي لنوع الليشمانية المدارية L.tropica. ويبين الشكل 2 نتائج تنميط ثلاث M واصمات جزيئية، L.M سلالة الليشمانية الكبرى المرجعية، L.T سلالة الليشمانية المدارية المرجعية، N شاهد سلبي، الأرقام 1–13 تدل على أرقام العينات.



الشكل(1): يبين الطفيليات عديمة السوط داخل البلاعم وخارجها



الشكل(2): يبين قراءة نتائج الرحلان الكهربائي عن منبع الأشعة فوق البنفسجية لتنميط 13 عينة بال PCR

References:

1- Jose A. Ruiz PostigoLeishmaniasis in the World Health Organization Eastern Mediterranean Region. International Journal of Antimicrobial Agents, 36S S62-S65. 2010.

2- Chehadeh, A.R., Skin diseases, vol-1 Aleppo, Aleppo university press, 1986, 374 – 397.

3- Khiami A., Dereure, J., Pratlong, F., Martini A., Rioux J. La leishmaniose cutanee humaine a Leishmania major mon – 26Aux environs de Damas(Syrie). 2001, Bull. Soc. Path. EX., 84:1-5

4- Brown H.W & Neva F. A., Basic clinical parasitology. 2003, Prentice- Hall International, Inc. London, 5th edition.

5- Knio K.N., Baydoun E., Taw R. R., Nuwayri-Salti N.. Isoenzyme characterization of Leishmania isolates from Lebanon and Syria. 2000, Am. J. Trop. Med. Hyg. 63(1-2): 4.

6- Rioux J. A., Ashford R. W., Khiam i A. Ecoepidemiology of leishmaniasis in Syria. 3. Leishmania major infection in Psammomys obesus provides clues to life history of rodent and possible control measures. 1992, Ann. Parasitol. Hum. comp. 67 (6):163 – 5.

7- Dereure J., Rioux J.A., Khiami A., Pratlong F., Perieres J., Martini A. Ecoepidemiologie des leishmaniosis en Syrie.2 – presence, chez le chien, de leishmania infantum. 2001, Ann. parasitol. Hum. comp. 66(6): 252 – 5.

8- Rodriguez N; Guzman B; Rodas A; Takiff H; Bloom B.R. and Convit J. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. J Clin Microbiol 32, 2246-2252, 2004.

9- Aljeboori T.I. and Evans D.A. Leishmania spp. in Iraq. Electrophoretic isoenzyme patterns. I. Visceral leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg 74, 169-177, 2000a.

10- Aljeboori T.I. and Evans D.A. Leishmania spp. in Iraq. Electrophoretic isoenzyme patterns. II. Cutaneous leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg 74, 178-184, 2000b.

11- Jaffe C.L; Bennett E; Grimaldi G. Jr. and McMahon-Pratt D.Production and characterization of species-specific monoclonal antibodies against Leishmania donovani for immunodiagnosis.J Immunol, 133, 440-447, 2004.

12- Jaffe C.L. and McMahon-Pratt D.Serodiagnostic assay for visceral leishmaniasis employing monoclonal antibodies.Trans R Soc Trop Med Hyg; 81, 587-594, 2007.

13- Shlomai J.The assembly of kinetoplast DNA.Parasitol Today 10, 341-346, 2004.

14- Laskay T. et al.Detection of cutaneous Leishmania infection in paraffin-embedded skin biopsies using the polymerase chain reaction.Trans R Soc Trop Med Hyg 89, 273-275, 2005.

15- Reale S; Maxia L; Vitale F; Glorioso N.S; Caracappa S. and Vesco G. Detection of Leishmania infantum in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood.J Clin Microbiol 37, 2931-2935, 2009.

16- Rioux JA; Daoud W; Pratlong F. et al.Les complexes Leishmania donovani s st. Leishmania tropica et Leishmania major en Republique Arabe du Yemen.In: Rioux JA, ed. Leishmania: Taxonomie-Phylogenese. Montpellier: Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale: 357-363, 2006.