



جامعة دمشق

كلية الصيدلة

قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة

## تنميط أنواع الليشمانية المسؤولة عن الإصابات الجلدية في اللاذقية

*Typing of Leishmania species responsible of cutaneous lesions  
in Lattakia*

رسالة أعدت لنيل درجة الماجستير في التشخيص المخبري

إعداد

الطالبة منال علي

المشرف المشارك

الأستاذ الدكتور عصام قاسم

المشرف

الأستاذ الدكتور محمد معروف

## جدول المحتويات :

1	..... الدراسة النظرية
2	.....1-تصنيف الطفيلي
3	.....2-أشكال الطفيليات
3	..... 1-2 شكل الليشمانة AMASTIGOTE
4	..... 2-2 شكل المشيقة PROMASTIGOTS
5	.....3-الناقل
5	.....4-المستودع
6	.....5-دورة حياة الطفيلي
7	.....6-الوبائيات
8	.....7-التظاهرات السريرية لداء الليشمانيات
9	.....8-داء الليشمانيات الجلدي
10	.....8-1 التشخيص التفريقي لداء الليشمانيات الجلدي
11	.....8-2 التشخيص المخبري لداء الليشمانيات الجلدي
11	.....8-3 الطرق المخبرية لتشخيص داء الليشمانيات الجلدي
12	.....8-4 الطرق التقليدية لتشخيص الليشمانية
12	.....8-4-1 الفحص المجهرى
14	.....8-4-2 زرع الطفيلي Parasite Culture
16	.....8-5 طرق التشخيص المناعي المصلية
18	.....8-6 الطرق الجزيئية المستخدمة في تشخيص داء الليشمانيات الجلدي
20	.....9-الطرق المستخدمة في التنميط
20	.....9-1 الطريقة المرجعية المعتمدة على تحليل نمط رحلان أنزيمات الليشمانية
21	.....9-2 الطرق الجزيئية لتنميط طفيليات الليشمانية
22	.....9-3 تقنية توصيم ساوثرن SOUTHERN BLOTTING
22	.....9-4 تعيين نوع الطفيلي باستخدام تفاعلات PCR
23	.....9-5 طريقة التعدادات الشكلية للدنا المضخم عشوائياً (RAPD) RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA
23	.....9-6 السوائل الصغيرة MICROSATELLITE
24	.....9-7 PCR-RFLP
25	.....9-8 التعدد الشكلي للسلسلة المفردة (SSCP) SINGLE STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM
25	.....9-9 سلسلة الدنا DNA SEQUENCING
26	.....10- المعالجة
27	.....10-1 مشتقات الأنتومان

28	.....AMPHOTERICIN B الأمفوتريسين
29	.....PENTAMIDINE البنتاميدين
29	.....أدوية أخرى
XXX	.....الدراسة العملية
31	.....1-مببرات البحث
31	.....2-هدف البحث
31	.....3-المواد والطرق
31	.....1-3 جمع العينات
33	.....2-3 عزل الطفيليات
35	.....3-3 عزل الدنا من العينات السريرية
37	.....4-3 تحضير محاليل ودوائى الرحلان
39	.....5-3فعالية الأدوية على الليشمانية في الزجاج
41	.....4-النتائج
41	.....1-4 توزع الإصابات في المناطق المختلفة لمحافظة اللاذقية
45	.....2-4 تتميط الذراري المسؤولة عن الإصابات الجلدية
48	.....3-4 حساسية الذراري للأدوية
53	.....5-المناقشة
58	.....6-الاستنتاجات
58	.....7-التوصيات
59	.....8-المراجع

## قائمة الأشكال

- الشكل 1 : الشكل النموذجي لليشمانات في البلاعم بعد تلويها بملون غيمزا ..... 4  
 الشكل 2 : البنية التفصيلية للمشيقات (أ) والشكل النموذجي للأشكال المتحركة في مستنبت زرع بعد تلويها بملون غيمزا (ب) ..... 4  
 الشكل 3 : الأتوباء الرئيسيون الذين يساهمون في انتشار طفيليات الليشمانية ..... 5  
 الشكل 4 : دورة حياة الطفيلي ..... 7  
 الشكل 5 : أنواع داء الليشمانيات ..... 10  
 الشكل 6 : الليشمانات النموذجية بعد التلوين بملون غيمزا ..... 12  
 الشكل 7 : طريقة أخذ العلاج ضمن الآفة ..... 27  
 الشكل 8 : نتائج اختبار كل من الفحص المجهرى المباشر للعينات، والزرع، وITS1-PCR ..... 45  
 الشكل 9 : الرحلان الكهربائي لعصابات عينتين مختلفتين إيجابيتين بعد التضخيم (قبل الهضم وبعد الهضم) ..... 47  
 الشكل 10 : حساب التركيز المثبط ل-50% من نمو الطفيليات المعزولة من احدى القرحات بعد معالجتها بأربعة تراكيز مختلفة ..... 50

## قائمة الجداول

- الجدول 1: الطرق المطبقة لتشخيص الليشمانية وحساسيتها ونوعيتها ..... 13  
 الجدول 2: أهم الإنزيمات المستخدمة في تنميط الأنواع المختلفة من طفيليات الليشمانية باستخدام طريقة الرحلان الكهربائي للنظائر الإنزيمية ..... 21  
 الجدول 3: المناطق المختلفة التي يقطن فيها المرضى الذين شاركوا في دراستنا ..... 42  
 الجدول 4: توزيع المرضى وفقاً للجنس والشرائح العمرية ..... 43  
 الجدول 5: عدد القرحات لدى المرضى الذين خضعوا للدراسة ..... 43  
 الجدول 6: قطر القرحات المشخصة لدى المرضى الذين خضعوا للدراسة ..... 44  
 الجدول 7: عمر القرحات لدى المرضى الذين خضعوا للدراسة ..... 44  
 الجدول 8: نتائج تطبيق الاختبارات على العينات 300 المأخوذة ..... 46  
 الجدول 9: العلاقة بين متوسط تراكيز IC50 لكل ذرية وعدد القرحات لدى المريض ..... 51  
 الجدول 10: العلاقة بين متوسط تراكيز IC50 لكل ذرية وقطر الإصابة التي تسببها هذه الذرية ..... 52  
 الجدول 11: العلاقة بين متوسط تراكيز IC50 لكل ذرية وقطر القرحات التي تسببها هذه الذرية ..... 52  
 الجدول 12: الفروق بين برامج تضخيم المجال ITS1 في الدراسات المختلفة ..... 55  
 الجدول 13: تبدلات التراكيز النهائية لمكونات تفاعل PCR ..... 56

## قائمة الاختصارات

<b>bp</b>	<b>base pair</b>
<b>BSA</b>	<b>Bovine Serum Albumine</b>
<b>cDNA</b>	<b>complementary (to RNA) DNA</b>
<b>CL</b>	<b>cutaneous leishmaniasis</b>
<b>DNA</b>	<b>deoxyribonucleic acid</b>
<b>dNTP</b>	<b>Deoxyribu nucleotide triphosphate</b>
<b>ELISA</b>	<b>enzyme-linked immunesorbent assay</b>
<b>EMTM</b>	<b>Evans Modified Tobie.s Medium</b>
<b>ESM</b>	<b>Enriched Synthetic Medium</b>
<b>H&amp;E</b>	<b>Hematoxyline-eosin</b>
<b>HSP</b>	<b>heat shock protein</b>
<b>IFAT</b>	<b>immunofluorescence assay test</b>
<b>ITS</b>	<b>Internal transcribed spacer</b>
<b>kb</b>	<b>Kilobase</b>
<b>kDNA</b>	<b>Kinetoplast DNA</b>
<b>L.</b>	<b>Leishmania</b>
<b>mRNA</b>	<b>messenger RNA</b>

<b>MCL</b>	<b>Major complex Lishmania</b>
<b>PBS</b>	<b>phosphate buffered saline</b>
<b>PBSS</b>	<b>Proline Balanced Salt Solution</b>
<b>PCR</b>	<b>polymerase chain reaction</b>
<b>RAPD</b>	<b>Random amplified polymorphic DNA</b>
<b>RFLP</b>	<b>restriction fragment length polymorphism</b>
<b>RNA</b>	<b>ribonucleic acid</b>
<b>rRNA</b>	<b>ribosomal RNA</b>
<b>RT</b>	<b>reverse transcriptase</b>
<b>SSCP</b>	<b>Singale Strand Conformation Polymorphism</b>
<b>TBE</b>	<b>tris borate EDTA buffer</b>
<b>WHO</b>	<b>World Health Organization</b>

## قائمة المصطلحات

أجزاء من سلاسل مفردة من الدنا لسلاسل مرجعية يجري تهجينها مع سلاسل الدنا المعزولة لليشمانيا المجهولة.	مسابير
هي تقنية حيوية جزيئية تستخدم لتضخيم الدنا	ال PCR
تقنية جزيئية تستخدم مسابير الدنا لتحديد نوع الليشمانيا	توصيم ساوثرن
طريقة حيوية تستخدم لتحديد تعدد الأشكال المورثي	PCR-RFLP
أنزيمات عزلت من نوع من البكتيريا لها القدرة على قطع سلاسل الدنا المضاعفة	إنزيمات القطع
المجال المنتسخ الداخلي الواقع بين تحت الوحدة الصغيرة وتحت الوحدة الكبيرة لمورثة الرنا الريباسي	ITS1
تحليل يستخدم لكشف الاختلافات بين جزيئات الدنا المفردة السلسلة على مستوى نوكليويتيد واحد.	SSCP

# الدراسة النظرية

## 1- تصنيف الطفيلي

طفيلي الليشمانية من وحيدات الخلية المجهرية وينتمي إلى جنس الليشمانية **Leishmania**. وطفيلي الليشمانية من السوطيات الدموية التي تنتمي إلى عائلة المتقيبات **Trypanosomatide**، ورتبة ذوات منشأ الحركة **Kinetoplasti**، وصف السواط الحيوانية **Zoomastigophora**، وتحت شعبة السواط **Mastigophora**، وشعبة السواط اللحمية **Sarcomastigophora**، وتحت مملكة وحيدات الخلية الاوالي **Protozoa**، والمملكة الحيوانية **Kingdom Animalia** (1).

يضم جنس الليشمانية **Leishmania** تحت جنسين هما الليشمانية **Leishmania** والفيانية **L. viannia**. يتواجد تحت جنس الليشمانية في العالم القديم والجديد ويشمل الطفيليات التي تتحول إلى الطور أمامي السوط في المعى الأمامي أو الوسطي للمضيف الناقل. يضم جنس الليشمانية المعقدات التالية :

أ- معقد الليشمانية الكبرى **L. major complex** في العالم القديم والذي يحوي نوع الليشمانية الكبرى **L. major**.

ب- معقد الليشمانية المدارية **L. tropica complex** في العالم القديم الذي يحوي نوعي الليشمانية المدارية **L. tropica**، والليشمانية الكيليكية **L. killicki**.

ت- معقد الليشمانية الدونوفانية **L. donovani complex** الذي يحوي نوع الليشمانية الشاغاسية **L. chagasi** في العالم الجديد، الليشمانية الدونوفانية **L. donovani** والليشمانية الطفلية **L. infantum** في العالم القديم. وما زال نوع الليشمانية الشاغاسية **L. chagasi** في العالم الجديد تحت المناقشة باعتباره نوع الليشمانية الطفلية نفسه.

ث- معقد الليشمانية الاثيوبية **L. aethiopia complex** في العالم القديم.

ج- معقد الليشمانية المكسيكية **L. mexicana Complex** في العالم الجديد الذي يحوي الأنواع التقليدية مثل الليشمانية المكسيكية **L. mexicana**، والليشمانية الأمازونية **L. amazonensis**، والليشمانية الفنزويلية **L. venezuelensis**، والليشمانية البيفانوية **L. pifanoi**.

أما بالنسبة لتحت جنس الفيانية فيقتصر تواجده على العالم الجديد ويضم طفيليات الليشمانية التي تتحول إلى الطور أمامي السوط في المعى الخلفي للمضيف الناقل والذي يضم المعقدات التالية :

أ- معقد الليشمانية البرازيلية **L. braziliensis complex** الذي يحوي نوعي الليشمانية البرازيلية **L. braziliensis** و الليشمانية البيروفية **L. peruviana**.

ب- معقد الليشمانية الغيانية **L. guyanensis** الذي يحوي الأنواع التالية لليشمانية البنامية **L. panamensis** ، الليشمانية الغيانية **L. guyanensis**.

ت- معقد الليشمانية لينسونية **L. jinsoni**.

ث- معقد الليشمانية **L. naiffi** (2).

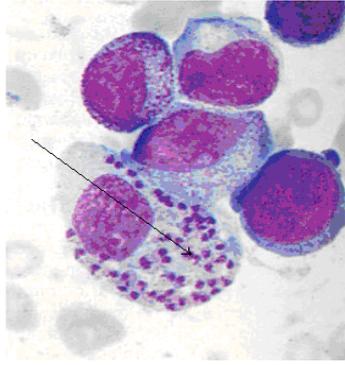
## 2- أشكال الطفيليات

تملك الطفيليات شكلين: الليشمانات والمشيقات.

### 1-2 شكل الليشمانة Amastigote

شكل لا سوطي غير متحرك يتواجد داخل خلايا جسم الانسان والحيوانات الخازنة للطفيلي مثل الكلاب والقوارض، حيث يعيش فقط في خلايا الجهاز الشبكي البطاني ضمن الوحيدات، (الشكل 1) وفي أدمة الجلد في النسيج البلغمي الجلدي.

الليشمانات أشكال بيضوية أبعادها بين 2-5 ميكرومتر، تمتلك نواة مدورة تتلون باللون البنفسجي الغامق عند تلويئها بملون غيمزا، ومنشأ حركة عصوي الشكل يتلون بلون أغمق من النواة مع بادئة جذرية صعبة الرؤية (3،4).

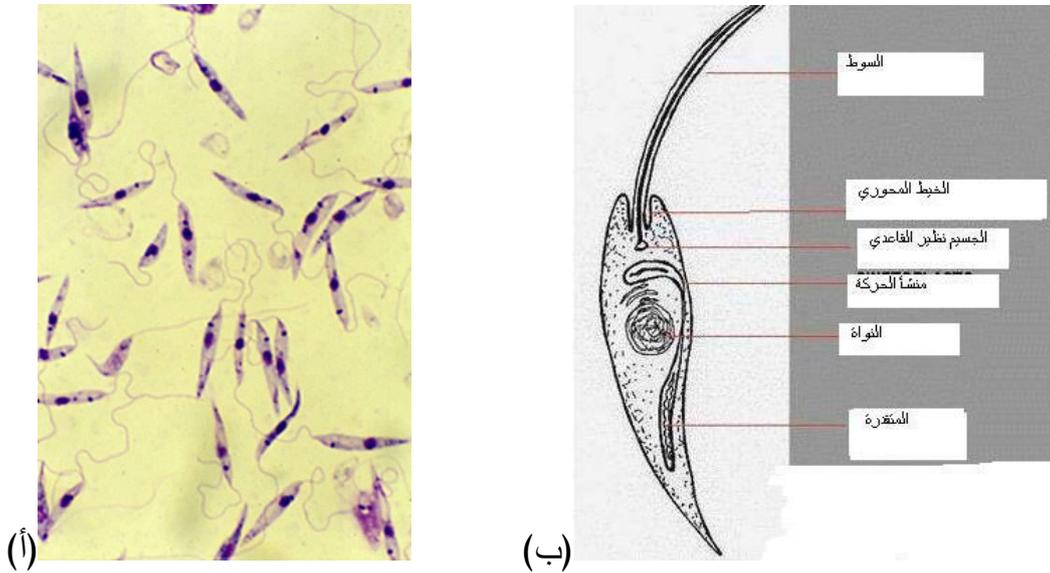


الشكل 1 : الشكل النموذجي لليشمانات في البلاعم بعد تلوينها بملون غيمزا. يشير السهم إلى

ليشمانة النموذجية التي تمتاز بوجود النواة ومنشأ الحركة (3).

## 2-2 شكل المشيقة Promastigots

أشكال سوطية متحركة يتراوح عرضها بين 1.5-3.5 ميكرومتر وطولها بين 15-20 ميكرومتر (الشكل 2) تمتلك سوطاً حراً وحيداً يتراوح طوله بين 15-28 ميكرومتر. تجتمع الأشكال الهرمة لتأخذ الشكل الوردي وتتم رؤيتها بعد التلوين بملون غيمزا.



الشكل 2 : البنية التفصيلية للمشيقات (أ) والشكل النموذجي للأشكال المتحركة في مستنبت

زرعي بعد تلوينها بملون غيمزا (ب) (3).

يوجد هذا الشكل عند حشرة ذبابة الرمل. المشيقات أشكال بيضوية متطاولة تتطور داخل القناة الهضمية لذبابة الرمل، حيث تنقسم ثنائياً في معدة الحشرة وتزداد أعدادها في القناة الهضمية

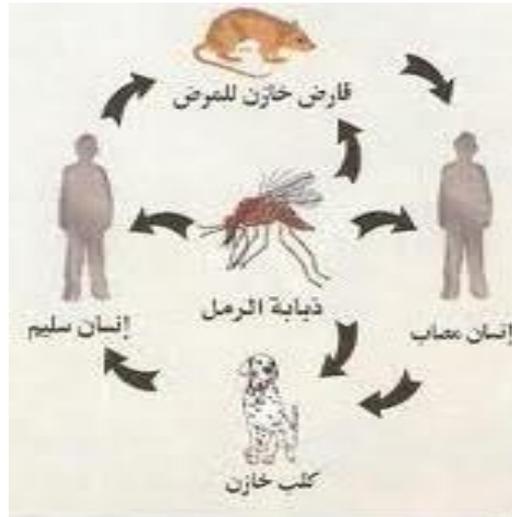
الأمامية والأجزاء الفموية للحشرة. تصبح الحشرة معدية بعد 5-20 يوماً من حصول الحشرة على وجبة الدم (4,3).

### 3- الناقل

تنتقل الطفيليات في العالم القديم بواسطة أنثى ذبابة الرمل من جنس الفاصدة **Phelebotomus** (5). تصنف هذه الحشرة ضمن رتبة ثنائيات الأجنحة **Dipteria** ، وعائلة **Phlebotomidae**، وتحت عائلة **Phlebotominae**. تضم تحت العائلة السابقة الأجناس التالية: **Phlebotomus**، و**Chinius**، و**Sergentomyia**، و**Broumtomyia** (7,6).

### 4- المستودع

تلعب أنواع الفقاريات المختلفة الأليفة والبرية مثل الكلاب والقطط والثعالب وابن آوى، دور الحيوانات الخازنة لطفيليات الليشمانية التي تصيب الإنسان. ويمكن التمييز بين نوعين من الحيوانات التي تلعب دور المستودعات : الحيوانات الأهلية الأليفة وتوجد بالقرب من المنازل المأهولة بالسكان، والحيوانات البرية. هذا ويمكننا من الناحية الوبائية (الشكل 3) التمييز بين ثلاثة أنواع من البؤر:



الشكل 3 : الأثوياء الرئيسيون الذين يساهمون في انتشار طفيليات الليشمانية (2).

1-بؤر أولية: تلعب فيها الحيوانات البرية، كالكليبات والقوارض **Rodents**، دور الخازن. يعد فأر الرمل السمين **Psammomys obesus** المستودع الرئيس لليشمانية الكبرى في الشرق

الأوسط. تنتشر هذه البؤر أيضا في أواسط آسيا، وبعض مناطق أمريكا اللاتينية. تنتشر الإصابات بداء الليشمانيات في هذه المناطق عند الحيوانات فقط ولا نجد سوى بعض الإصابات الفردية بين السكان (2،1).

2-بؤر ثانوية: تلعب فيها الكلاب دور الخازن. تُعد الكلاب، إضافة إلى كل من الثعالب والذئاب، الخازن الرئيس لأنواع الليشمانية المسببة لداء الليشمانيات الحشوي في منطقة البحر المتوسط.

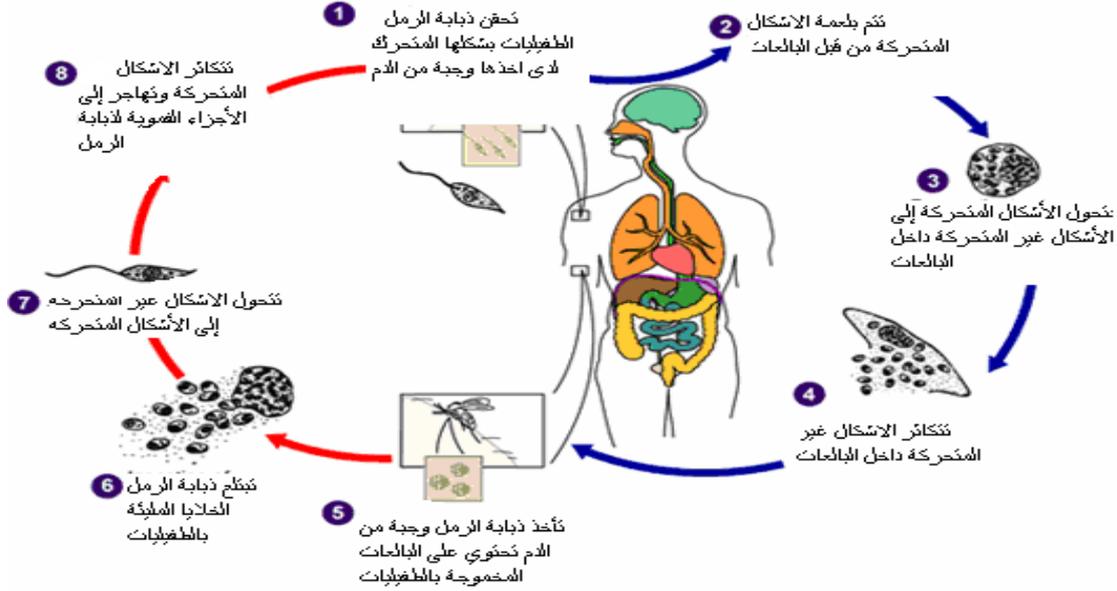
3-بؤر ثالثة: يلعب فيها الإنسان دور الخازن الرئيسي للطفيلي. وتعد طفيليات الليشمانية المدارية أكثر الطفيليات شيوعاً في هذه البؤر (7).

### 5-دورة حياة الطفيلي

تلعب الفاصدة دور الثوي النهائي لطفيليات الليشمانية، ويلعب الإنسان دور الثوي الوسط. فعندما تلدغ الفاصدة إنسان أو حيوان مصاب لتأخذ وجبتها الدموية تأخذ مع الدم ليشمانات الطفيلي (الشكل 4)، حيث تتحول عندها إلى مشيقات تتكاثر ضمن أمعاء الفاصدة ثم تصعد إلى فم الفاصدة وتصبح مشيقات خامجة **metacyclic promastigotes** بعد مدة تتراوح بين 8 - 15 يوم ولكنها لا تدخل الغدد اللعابية.

يصاب الإنسان بهذه الطفيليات عندما تلدغه الفاصدة، حيث تتقيأ أثناء ذلك وتخرج المشيقات الخامجة التي تتوضع على موقع اللدغة وتعتبر بذلك الجلد إلى الأنسجة، الأمر الذي يؤدي إلى موت أعداد كبيرة منها نتيجة لاحتواء سوائل أنسجة الجسم على مواد حائلة للخلايا، ونتيجة لبلعمة المشيقات الأخرى من قبل البلاعم الموجودة في جلد الثوي. تبتلع البلاعم الموجودة المشيقات وتتحول ضمن البلاعم إلى ليشمانات. وتستطيع أن تقاوم الآليات القاتلة للبلاعم وبالتالي التكاثر ضمنها بالانشطار الثنائي، مما يؤدي بعدها إلى انفجار هذه الخلايا وتحرر الليشمانات منها وبلعمتها من قبل بلاعم أخرى وبالتالي إصابة هذه البلاعم (9،8). يمكن أن تبقى البلاعم المصابة بالعدوى المخموجة في الجلد وتسبب الداء الجلدي، أو تنتشر عبر الجهاز الشبكي البطاني إلى أعضاء الجسم المختلفة كالكلب، و الطحال، و النقي، و العقد اللمفية، حيث تسبب الداء الحشوي وفقا لنوع الليشمانية.

يحدث في داء الليشمانيات الجلدي تكاثر موضعي فقط للطفيليات، حيث تقتصر الإصابات بالليشمانيات المدارية والمكسيكية على إصابة الخلايا الشبكية البطانية في الجلد، وتشفى الإصابات الجلدية عادة من تلقاء نفسها دون الحاجة لأي علاج.



الشكل 4 : دورة حياة الطفيلي (8)

أمّا في الداء الحشوي والجلدي المخاطي فتنتشر الطفيليات من الجلد، عبر الدم، لتغزو مناطق أخرى من الجسم، حيث تنتقل طفيليات الليشمانيات البرازيلية مثلاً بعد غزوها الخلايا الشبكية البطانية في الجلد إلى الأغشية المخاطية للأنف والفم والبلعوم مؤدية إلى تشوهات خطيرة يمكن أن تؤدي إلى موت المريض (9,8).

## 6- الوبائيات

داء الليشمانيات هو داء مستوطن ينتشر في 88 بلد وتتراوح نسبة الحدوث السنوية بين 1-1.5 مليون حالة بداء الليشمانيات الجلدي و0.5 مليون حالة بداء الليشمانيات الحشوي. يقدر عدد المعرضين لخطر الإصابة في العالم بحوالي 350 مليون شخص وعدد المصابين بحوالي 12 مليون شخص. أدى التطور الإقتصادي، والتأثير المتبادل بين الإنسان وبيئته، واستقرار الإنسان في تجمعات سكنية جديدة في مختلف أنحاء العالم إلى نمو سريع لمدن ضخمة تتطلب توفر مجموعة من الخدمات كتوفر خدمات مياه الشرب وشبكات الصرف الصحي، الذي يؤدي عدم

توفرها بشكل كاف إلى توفير ظروف مناسبة لانتشار العوامل المسببة للأمراض السارية مثل الليشمانيّة (10،8).

تنتشر أكثر من 90% من حالات الليشمانيّة الجلدية في أفغانستان، و إيران، والسعودية، وسورية. وتنتشر الليشمانيّة الجلدية في سورية مع وجود حالات قليلة من الليشمانيّة الحشوية في درعا والسويداء. تقسم الليشمانيّة الجلدية وبائياً في سورية إلى نوعين: نوع ناجم عن الليشمانيّة الكبرى، حيث تنتشر في عدة مناطق من سورية الضمير، والناصرية، والرحبية، وشرق قاسيون، ودير الزور، والحسكة، و الرقة (10،8). بينما تنتشر الليشمانيّة المدارية الصغرى في طرطوس، وحلب، وحماه، وادلب، وغرب قاسيون، واللاذقية. ويترافق انتشار الليشمانيّة في سورية مع مناطق انتشار الفواصد (12،11). ويعود انتشار الليشمانيّة المدارية في المناطق السابقة للفائدة الباباتاسية والسرجنيتية. و يعد الانسان خازناً أساسياً لها بينما تلعب الحيوانات الأخرى دور خوازن ثانوية. أما الليشمانيّة الكبرى فتنتشر في منطقتها الفاصدة الباباتاسية ويلعب الإنسان دور خازن ثانوي، بينما يلعب دور الخازن الأساسي جردّ بساموميس (14،13). تلعب البيئة دوراً هاماً في انتشار النوعين، حيث تلعب دوراً في الحفاظ على الخازن من خلال توفير الغذاء الملائم لها، حيث يتغذى الجردّ على عشبة الشنان وينتشر في المناطق التي تتوفر فيها. وغالباً ما تكون مناطق انتشار المرض هي مناطق مخالقات سكنية تفتقر إلى الخدمات العامة، مما يوفر البيئة الملائمة لتكاثر الحشرة الناقلة.

أما بالنسبة لداء الليشمانيات الحشوي في سورية، فلقد شخصت إصابتان بداء الليشمانيات الحشوي في منطقة كسب عام 1958م، كما عزلت طفيليات الليشمانيّة الطفلية من الكلاب في المنطقة نفسها. وشخصت في السنوات الأخيرة إصابات جديدة بداء الليشمانيات الحشوي في محافظات إدلب، وحلب، واللاذقية، وطرطوس، ودرعا (14،11).

## 7-التظاهرات السريرية لداء الليشمانيات

تسبب طفيليات الليشمانيّة عدة أشكال سريرية. وتشمل الأشكال الرئيسية كل من داء الليشمانيات الحشوي وداء الليشمانيات الجلدي وداء الليشمانيات الجلدي المخاطي. وبما أن هذه الدراسة تركز على داء الليشمانيات الجلدي، سنقوم باستعراض الأمور الأساسية المتعلقة بهذا الداء.

## 8-داء الليشمانيات الجلدي

أطلق على هذا الداء تسميات محلية وفقاً للمنطقة التي ينتشر فيها فسمي بدمل الشرق، أو حبة حلب، أو حبة السنة، أو حبة بغداد، أو حبة النيل، أو حبة دلهي، أو حبة جرش. ويتراوح عدد الحالات الجديدة المسجلة سنوياً بين 1 - 1.5 مليون في العالم. وينتشر هذا الداء في حوض البحر المتوسط مثل سورية، وكذلك في المناطق الإفريقية، والشرق أوسطية منه، وكذلك في أوروبا الشرقية (2). تتوضع الآفات على المناطق المكشوفة من الجسم كالوجه واليدين والساعدين والساقين والقدمين، ويرتبط توزيعها بتقاليد اللباس في كل منطقة من المناطق التي ينتشر فيها الطفيلي. يمكن التمييز بين شكلين لهذا الداء شكل جاف أو شكل رطب (2,13,15).

### الشكل الجاف أو المديني

يعد الشكل الكلاسيكي وتسببه الليشمانية المدارية ويلعب الإنسان على الصعيد الوبائي دور الخازن للطفيلي. ويعد هذا الشكل الأكثر شيوعاً في معظم مناطق البحر المتوسط. تتجاوز فترة الحضانة الشهرين ويمكن أن تصل حتى سنتين. و عادة لا يتجاوز قطر الآفة 1 - 2 سم، ويصيب كافة الشرائح العمرية (الأطفال والكبار). تكون الإصابة عادة وحيدة رغم وجود حالات بلغ فيها عدد الآفات 20 أو 30 أو 40 عند المريض نفسه، كما شخصت حالات نادرة في حلب بلغ عدد الآفات فيها 151 آفة، و تتمركز الآفات على المناطق المكشوفة من الجسم. تبدأ الإصابة بظهور حطاطة التهابية حاكة قليلاً تظهر في موقع نقطة لدغ الفاصدة. تتطور الإصابة ببطء خلال عدة أشهر لتتشكل عقيدة تترافق مع ارتشاح عميق ولكن لا تلتصق بالنسج الواقعة تحتها. ثم تنقرح العقيدة نتيجة انقطاع التروية الدموية عنها، نتيجة الأذية المخربة للطفيلي، وتغطي بقشرة سميكة نوعاً ما تلتصق بشكل جيد بالآفة. تتميز الآفة بكونها غير مؤلمة، ولا تترافق بضخامة عقد لمفية، ولا تستجيب لأي نوع من المضادات الحيوية. عند نزع القشرة يظهر سطحها السفلي وجود استنطالات دقيقة تنغمس في المنطقة المنقرحة، ولا يظهر نزعها وجود أي مادة قيحية تحتها وإنما يوجد سائل مصلي مدمى. تشفى هذه الآفات عفويًا بعد 8 - 12 شهراً عادة، لكن يمكن أن يتأخر الشفاء حتى سنتين أحياناً. يترافق الشفاء مع سقوط القشرة كما يترك ندبة دائمة يمكن أن تكون في بعض الأحيان واضحة للعيان.

### الشكل الرطب أو الريفي

ينتشر في المناطق الريفية شبه الصحراوية، وشرق البحر المتوسط، وأوروبا الشرقية، وآسيا الوسطى، وأفريقيا. تتجم الإصابة بالليشمانية الكبرى التي تتطفل أساساً على القوارض البرية التي تشكل الخازن الرئيسي للطفيلي، حيث يصاب الإنسان بشكل عارض. تكون فترة الحضانة قصيرة، تتراوح بين أسبوع واحد و شهرين. تتشكل بسرعة قرحة كبيرة يصل قطرها حوالي 6 سم. تكون العلامات الالتهابية شديدة تترافق أحياناً بالتهاب أوعية لمفية وضخامة عقد لمفية، تتطور الآفة نحو الشفاء العفوي خلال 3 - 5 أشهر. ولكنها غالباً تترك ندبة كبيرة. ويعد وجود الآفات المتعددة شائعة وتتوضع بشكل رئيسي على الطرفين السفليين (13،15).



(ج) داء الليشمانيات  
الحشوي



(ب) داء  
الليشمانيات الجلدي



(أ) داء الليشمانيات  
الجلدي المخاطي

الشكل 5 : أنواع داء الليشمانيات (13).

### 1-8 التشخيص التفريقي لداء الليشمانيات الجلدي

يمكن أن يخطئ الأطباء غير المعتادين على رؤية حالات الإصابة بداء الليشمانيات الجلدي في تشخيص الآفة، حيث يمكن أن يعتبرونها كعدوى بكتيرية عادية خاصةً 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 دليلاً على إصابة جلدية تعود لليشمانية الجلدية (16).

يشكل تشخيص داء الlishمانيات الجلدي تحدياً للأطباء ويعود ذلك للتنوع الكبير للتظاهرات السريرية التي يسببها، والاختلاف في شدة الآفات الجلدية وعمرها في جسم المريض، وتنوع طفيليات الlishمانية المسببة لداء الlishمانيات الجلدي، والخط بين تشخيص هذا الداء والأمراض الجلدية المختلفة المشابهة مثل داء السل الجلدي، وداء الجذام، وداء الشعريات المبوغة، وداء الفطار الكرواني، والأورام الخبيثة (17،18،19).

### 8-2 التشخيص المخبري لداء الlishمانيات الجلدي

تعد قصة 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 الlishمانيات 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 الlishمانية المسببة بشكل دقيق (20).

### 8-3 الطرق المخبرية لتشخيص داء الlishمانيات الجلدي

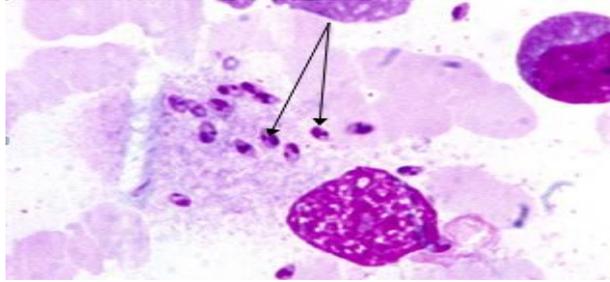
تسمح هذه الطرق بتأكيد وجود الطفيلي في العينات المعزولة من الآفات الجلدية. تصنف هذه الطرق ضمن ثلاث مجموعات: الطرق التقليدية للتشخيص، الطرق المصلية للتشخيص، الطرق الجزيئية للتشخيص. تختلف هذه الطرق من حيث الحساسية، والنوعية، ومدة الإنجاز، والفائدة العملية التي تقدمها الطريقة للطبيب والمريض في آن واحد، ويوضح الجدول 1 الطرق المستخدمة في تشخيص الlishمانية جميعها (22).

## 4-8 الطرق التقليدية لتشخيص الليشمانية

### 1-4-8 الفحص المجهرى

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 الليشمانية، 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 اشهر. في حالة وجود عدة آفات يتم اختيار الآفة الأكبر والأكثر رطوبة (22).

يجرى تلوين الفيلم باستخدام ملون غيمزا أو ملون **hematoxyline-eosine H&E** حيث تتلون النواة بالأزرق ومنشأ الحركة بلون قرنفلي وتأخذ الكريات الحمراء لوناً برتقالياً (الشكل 6). ويستخدم ملون **Romnowsky** الذي يؤدي إلى تلوين النواة بلون أرجواني إلى قرنفلي (23).



الشكل 6 : الليشمانات النموذجية بعد التلوين بملون غيمزا (23).

الجدول 1: الطرق المطبقة لتشخيص الليشمانية وحساسيتها ونوعيتها (22).

الطريقة	الهدف	المشارع	الحساسية والنوعية	زمن ظهور نتيجة الاختبار
الفحص المجهرى (تقليدي)	رؤية ليشمانات	-	الحساسية 50-85% النوعية 100%	5-15 دقيقة
الزرع (تقليدي)	رؤية مشيقات	-	الحساسية 50-65% النوعية 100%	5-21 يوم
حقن حيوانات التجربة تقليدي	احداث اصابة عند الحيوان	-	الحساسية 41-57% النوعية 100%	2-12 اسبوع
اختبار مونتغرو (مصلي)	وجود فرط تحسس خلوي ناتج عن اصابة مسبقة	-	الحساسية متغيرة النوعية ضعيفة نتيجة التفاعلات المتصالبة	48-72 ساعة
الطرق المناعية المصلية	كشف الأضداد أو مستضدات الطفيلي	-	لا تستخدم لتشخيص الاصابة الجلدية أما بالاصابة الحشوية الحساسية 69-90% النوعية متغيرة نتيجة التفاعلات المتصالبة	من 10 دقائق الى 18 ساعة للتراص المباشر
أضداد وحيدة النسيلة (مصلي)	كشف مستضدات الطفيلي في العينة	-	الحساسية < 90% النوعية 100%	1-2 ساعة
مسابير الدنا (جزيئي)	كشف الدنا للطفيلي	-	الحساسية 100% النوعية 100%	1 ساعة
PCR (جزيئي)	KDNA	13A\13B	الحساسية 96.6% 100% النوعية 96%	1-3 ساعة
PCR (جزيئي)	ITS1	LITSR\L5.85	الحساسية 91% النوعية 100%	1-3 ساعة
Real-time PCR (جزيئي)	kDNA	RV2\RV1	الحساسية 86-100% النوعية 100%	1-3 ساعة
RT-PCR (جزيئي)	الرنا الريباصي		الحساسية 98.6% النوعية 100%	1-3 ساعة

يعد ملون غيمزا الملون الأكثر استخداماً حيث يلون الليشمانية 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 (23) ومنشأ

الحركة بلون أزرق قرنفلي إلى أرجواني مع هبولى زرقاء شاحبة. ويكون منشأ الحركة أصغر وأشد كثافة من النواة ويظهر بشكل عصية مستديرة (24).

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 المقترحة أولاً.

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 المجهرى. يمكن رؤية الليشمانات بتكبير 100X وبوجود زيت الأرز، إما داخل البلاعم أو خارجها ولا يمكن الجزم بوجود الطفيلي مالم يتم رؤية النواة ومنشأ الحركة.

#### 2-4-8 زرع الطفيلي Parasite Culture

يستخدم الزرع لتشخيص حالات الليشمانية الناكسة، أو الآفات القديمة أو إصابات الأغشية المخاطية والجلدية الناجمة عن طفيليات الليشمانية البرازيلية، وعزل الطفيليات التي لا نستطيع كشفها بتقنية الفحص المجهرى. يجري الزرع على أوساط سائلة أو ثنائية الطور أو أوساط صلبة وحيدة الطور. وعلى الرغم من كون الزرع هو أفضل طريقة لتشخيص الليشمانية بسبب النوعية العالية إلا أن المشكلة في انخفاض الحساسية لا تزال مستمرة. تزداد حساسية الزرع عند إجراء خمس زراعات للآفة نفسها وتزداد الإيجابية كلما كان عدد الطفيليات في العينة المختبرة مجهرياً أكبر (22).

يختلف نمو الأنواع المختلفة لطفيليات الليشمانية وسرعته على أوساط الزرع، حيث يكون بعضها صعب النمو وبالتالي يحتاج إلى أوساط أغنى، مثل الليشمانية البرازيلية التي يكون نموها أصعب

من نمو الليشمانية المكسيكية. تشمل العينات المزروعة المادة المأخوذة بالمشروط 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 طور اللوغاريتمي الذي يمتد من اليوم الثالث حتى اليوم الخامس. ومن ثم يبدأ طور الاستتباب بدءاً 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 (25).

يمكن استخدام عدة أنواع من المستنبتات للزرع وهي تشمل: وسط NNN، وسط شنايدر، وسط M199، وسط ESM، وسط EMTM، وسط RPMI 1640، وسط Sloopy Evans.

#### وسط Novy-Mac-Neal-Nicolle-Medium NNN

يحتوي كل لتر من هذا الوسط 14 غرام آغار **Bacto-Agar**، و6 غرام كلوريد الصوديوم **NaCl**، و900 مل ماء مقطر. يعقم الوسط في الصاد الموصل بدرجة حرارة 121 °C لمدة 15 دقيقة ثم يضاف له دم أرنب منزوع الفيبرين بنسبة 5%، يعد الدم المكون الأساسي للوسط ويفضل دم الأرنب على الأنواع الأخرى من الدم. وحرصاً على منع حدوث التلوث الجرثومي تضاف مضادات حيوية مثل: مزيج البنسلين بمقدار 200 وحدة/مل من الوسط والستربتومايسين بمقدار 400 مكغ/مل، أو يكتفى بإضافة الجنتاميسين بمقدار 50-100 مكغ/مل. يوزع الوسط الناتج بمعدل 5 مل في أنابيب زجاجية محكمة الإغلاق ويترك الآغار ليجمد بوضعية مائلة. يمكن أن يكون الوسط السائل إما محلولاً "Lock solution" وهو سائل متكتفاً على سطح الآغار أو محلولاً متوازن الأملاح **PBSS** حاوي على البرولين **Proline balanced salts solution**. تنمو الطفيليات على هذا الوسط خلال فترة تتراوح بين يومين إلى 21 يوماً (26).

#### وسط RPMI 1640

يخلو هذا الوسط من الآغار ودم الأرنب. يتألف كل لتر منه من 0.1 غ نترات البوتاسيوم، و0.488 غ كبريتات المغنيزيوم، و0.4 غ كلوريد البوتاسيوم، و6 غ كلور الصوديوم، و0.8 غ

فسفات الصوديوم، بالإضافة للحموض الأمينية الموجودة في وسط شنايدر. كما يحتوي الوسط مجموعة من الفيتامينات، تشمل حمض الفوليك وبيريدوكسين وريبوفلافين وثيامين و**VitB1**، وغلوكوز. يضاف للوسط مصّل العجل الجنيني المعطل بالحرارة بنسبة 10% مباشرة قبل الإستخدام ويضاف له البنسلين 100 وحدة/مل والستربتومايسين 100 مكغ/مل (21).

يحضر الوسط بإذابة البودرة بنسبة 90% من الحجم النهائي للماء الذي يجب أن تكون درجة حرارته 15-20°C، تضاف كمية إضافية من الماء مع ضبط درجة الـ pH=4 لضمان حل المسحوق بشكل كامل ثم ترفع الـ pH = 7.2 قبل إضافة البيكربونات. ثم يتم الإكمال إلى الحجم النهائي ناقص حجم بيكربونات الصوديوم والغلوتامين التي ستضاف لاحقاً. يعقم المحلول بالصاد الموصل بدرجة حرارة 121°C لمدة 15 دقيقة ثم يبرد المحلول إلى الدرجة 15-20°C. عند الإستخدام يضاف لكل لتر من الوسط المحضر 26.7 مل من محلول بيكربونات الصوديوم المعقم ذو التركيز 7.5 غ/ل ماء، و 1.025 مل من محلول الميسر (ل- غلوتامين) المعقم ذو التركيز 0.3 غ/ل لكل لتر، مما يؤدي إلى تبدل الـ pH. ويتم إعادة ضبط درجة الـ pH النهائية على 7.2 بواسطة محلول حمض كلور الماء 1 نظامي وماءات الصوديوم 1 نظامي. يمكن أن يعاد تعقيم الوسط ومن ثم حفظه بدرجة حرارة تتراوح بين 2-8°C. ويستخدم الوسط للحصول على كميات كبيرة من الطفيلي لتتميطها. وتتم الطفيليات على هذا الوسط خلال 16 ساعة (22,27).

### 8-5 طرق التشخيص المناعي المصلية

تمتاز الطرق التقليدية بانخفاض نوعيتها وحساسيتها، حيث لا تسمح بالتمييز بين الإصابة بالليشمانية والإصابة بالمتقيبات ولها تفاعلات متصالبة مع الملاريا وداء المقوسات وداء الاميبيا. وتعتمد هذه الطرق على مقايسة عيار الأضداد في مصّل المريض أو المستضدات.

تعطي هذه الطرق نتائج سلبية عند تشخيص الليشمانية الجلدية لانخفاض عيار الأضداد في المصل بسبب موضعية المرض لذا لا تستخدم. وينبغي اللجوء إلى تفاعل الـ PCR لتشخيص داء الليشمانيات الجلدية وداء الليشمانيات الجلدي المخاطي. تم بنجاح استخدام الأشكال

المتحركة والليشمانات كمستضدات نوعية في اختبار الإليزا و **IFAT** لتشخيص الليشمانية الحشوية (28).

تم اختبار العديد من البروتينات الطفيلية المؤشبة كمستضدات في اختبار الإليزا والتراص المباشر، حيث أظهر المستضد المأشوب **K39** أفضل النتائج، محققا حساسية من 64-100%، ولم يظهر هذا المستضد تفاعلات متصالبة مع أنواع المتقبيات 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.

### أضداد وحيدة النسيلة **Monoclonal Antibodies**

تمتاز هذه الطريقة بحساسيتها العالية ونوعيتها الكبيرة عند مقارنتها بالطرق التشخيصية التقليدية. وتستخدم هذه الطريقة لتشخيص مستضدات الليشمانية للليشمانات الطفيلي في العينات او الخزعات النسيجية (29).

يجري تحضير هذه الأضداد بحقن فئران **BA1C/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 بثنيت 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 بالبيريوكسيداز، أو باستخدام أحد الأجهزة التي تقيس التآلق عند استخدام أضداد متألفة، أو باستخدام أحد أجهزة قياس الإشعاع عند استخدام أضداد موسومة بمادة مشعة وينحصر استخدام الأضداد الأخيرة في مراكز الأبحاث (30).

## 8-6 الطرق الجزيئية المستخدمة في تشخيص داء الليشمانيات الجلدي

تكشف عن الحموض النووية للطفيلي في مختلف العينات.

### 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، لسلاسل مرجعية لأنواع المختلفة من الليشمانية تسمى مسابير. تستخدم هذه المسابير لتجهين سلاسل الدنا المتممة المعزولة من عينات الليشمانية المجهولة، يلتحم المسبار مع السلاسل المتممة له فيتشكل شريط دنا مضاعف يمكن الكشف عنه بواسطة مقياس التآلق عندما يكون المسبار موسوما بمادة متألقة **Fluorophore**، أو بوسمه بواسطة ناشبة والكشف عنه بواسطة تفاعل إنزيمي مناعي (30). وتمتاز هذه الطريقة بحساسيتها الكبيرة حيث تسمح بكشف أعداد من الطفيليات تتراوح بين 100-1000 طفيلي ملطخ على فلاتر نايلون.

### الطرق المعتمدة على استخدام التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR

يشكل تفاعل الـ **PCR** تقنية حيوية جزيئية حساسة ونوعية جداً، 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، وإمكانية تطبيقها على العينات مباشرة دون اللجوء إلى عزل الطفيليات بالزرع، وسرعة تطبيقها، حيث نحصل على النتيجة خلال عدة ساعات (28).

### مميزات استخدام التفاعل السلسلي للبوليميراز في تشخيص داء الليشمانيات الجلدي

1. تمتاز هذه الطرق بدرجة عالية من الحساسية والنوعية، حساسيتها أعلى من حساسية الفحص المجهرى والزرع خاصة في العينات التي ينخفض فيها عدد الطفيليات، كما في داء الليشمانيات الجلدي المخاطي (31).

2. تسمح هذه الطرق بتحديد كمية الطفيليات في النسيج 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 الليشمانية (31).

3. يسمح استخدام التضخيم للدنا بتحديد نوع الليشمانية، مما يكسب هذه الطرق أهمية كبيرة عند التدبير السريري لمرضى الليشمانية. حيث توجد علاقة بين الإصابة ببعض أنواع الليشمانية من جهة، وشدة المرض من جهة أخرى، وفعالية المعالجة من جهة ثالثة (31).

4. يمكن استخدام الـ PCR لتحديد السمات النوعية للطفيلي مثل الفوعة ومقاومة الأدوية، وبالتالي يسمح تحديد المعالجة الأكثر فعالية أو حتى تحديد المرضى الأكثر عرضة لخطورة تطور MCL (Major complex Lishmania) (31).

5. 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 واصمات 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 الريباصي.

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

بشكل عام يؤدي تفاعل PCR دورين مهمين في البيولوجيا الجزيئية، فهو يسمح أولاً بزيادة كمية المادة الجينية وبالتالي إمكانية تحليلها بتقانات جزيئية أخرى مثل تحديد تسلسل الدنا

**sequencing DNA و RFLP** لتحديد الأنواع والسلالات التابعة لطيفلي من الطفيليات (31).

### 9- الطرق المستخدمة في التنميط

#### 9-1 الطريقة المرجعية المعتمدة على تحليل نمط رحلان أنزيمات الليشمانية

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

تعتمد هذه الطريقة على كون البروتينات المختلفة تمتلك قابلية حركة مختلفة بالرحلان الكهربائي. ويتم تطبيق تقنية الرحلان الكهربائي للنظائر الإنزيمية لخزين طفيليات الليشمانية 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 الليشمانية، حيث تمتلك كل سلالة نمطاً مميزاً لرحلان إنزيماتها (28).

تتنتمي السلالات التي تمتلك النمط الإنزيمي نفسه **Zymodeme** إلى الوحدة التصنيفية نفسها. وهو يشير إلى مجموعة من طفيليات الليشمانية التي تمتلك إنزيماتها نمط الرحلان ذاته. وجرت دراسة حركية 15 إنزيماً معروفاً على الأقل، عند تنميط طفيليات الليشمانية، ويبين الجدول 2 أهم هذه الإنزيمات (32).

الجدول 2: أهم الإنزيمات المستخدمة في تمييز الأنواع المختلفة من طفيليات الليشمانية باستخدام طريقة الرحلان الكهربائي للنظائر الإنزيمية (32).

إيزو سترات ديهيدروجيناز <b>ICD</b>	مالات ديهيدروجيناز <b>MDH</b>
فسفو غلوكو موتاز <b>PGM</b>	إنزيم المالك <b>ME</b>
نوكلبيوزيد هيدرولاز اينوزين <b>NHI</b>	سوبر أكسيد ديسموتاز <b>SOD</b>
غلوتامات ديهيدروجيناز <b>GLUD</b>	6 فسفو غلوكونات ديهيدروجيناز <b>PGD6</b>
ديافوراز <b>DIA</b>	غلوكوز 6 فسفات ديهيدروجيناز <b>G6PD</b>
غلوكوز فسفات ايزو ميراز <b>GPI</b>	مانوز فسفات ايزو ميراز <b>MPI</b>
غلوتامات أكزالو أسينات ترانس أميناز <b>GOT1-GOT2</b>	فومات هيدراتاز <b>FH</b>
	نوكلبيوزيد فسفوريلاز <b>NP1-NP2</b>

### 9-2 الطرق الجزيئية لتنميط طفيليات الليشمانية

هي الطرق الأكثر استخداماً لأنها لا تحتاج إلى جهد كبير. وتستطيع هذه الطرق تمييز الأنواع المختلفة لطفيليات الليشمانية. وتشمل طريقة تهجين ساوثرن **Southern blotting** والطرق التي تعتمد على تضخيم الدنا. على الرغم من أهمية هذه الطرق في تشخيص الليشمانية 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 الليشمانية الطفلية والليشمانية الشاغاسية، مما يظهر أنهما نوعان متطابقان (28).

2. لم تجزم لنا الطرق الجزيئية في ما إذا كانت طفيليات الليشمانية تتكاثر جنسياً أم لا جنسياً. وجرى التفسير بوجود التشابه بين الجينات التي تعود لأنواع مختلفة من الطفيلي، كونه ناجماً عن التهجين بين هذه الأنواع نتيجة التزاوج الجنسي بينها (28).

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.

### 9-3 تقنية توصيم ساوثرن Southern Blotting

تحتاج هذه الطريقة إلى زرع الطفيلي ثم جمع الطفيليات واستخلاص الدنا منها، ومن ثم إجراء رحلان كهربائي على الهلام، ثم إجراء توصيم ساوثرن Southern Blotting، وأخيراً إجراء التهجين بمسابير الدنا التي تستهدف دنا منشأ الحركة. وجرى تطوير مسابير من دنا الحلقات الصغيرة لمنشأ الحركة لطفيليات الليشمانية الكبرى *L. major* ولسلالات طفيليات الليشمانية الطفيلية *L. infantum* (28).

كما جرى وصف مجموعة من المسابير المشتقة من تسلسلات مختلفة من الدنا النووي مثل مسبار cDNA الحاوي عدة نسخ من تسلسل متكرر يبلغ طوله 60bp معزول من الليشمانية الدونوفانية *L. donovani* يتجهن نوعياً مع عزلات من معقد الليشمانية الدونوفانية فقط (36,35,28).

### 9-4 تعيين نوع الطفيلي باستخدام تفاعلات PCR

تعد تفاعلات PCR التي 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/13A أو على مستوى النوع، باستخدام مشارع تشخص الليشمانية الدونوفانية مباشرة دون الحاجة إلى التقطيع بإنزيمات التقطيع (41،42). تستهدف هذه المشارع تسلسل دنا الحلقات الصغيرة في منشأ الحركة بطول 792bp، خاص بالليشمانية الدونوفانية وتتألف هذه المشارع من تسلسلات الدنا التالية:

5`-AAATCGGCTCCGAGGCGGGAAAC-3` و

5`-GTACACTCTATCAGTAGCAC-3`

كما استخدمت المشارع

5`-TCGCAGAACGCCCTACC-3` و

5`-AGGGGTTGGTGTAAAAATAGGC-3`

التي تستهدف أيضا "دنا الحلقات الصغيرة في منشأ الحركة للتمييز بين الليشمانية الكبرى، حيث تعطي عصابة بطول **620bp**، والليشمانية 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 الليشمانية في العالم الحديث (28).

### 5-9 طريقة التعدادات الشكلية للدنا المضخم عشوائياً **Random amplified polymorphic DNA (RAPD)**

إن تطبيق هذه الطريقة لا يحتاج إلى امتلاك معرفة مسبقة بتسلسل نوكلوتيدات الدنا الهدف، ولا يتطلب تهجين الدنا. وتستخدم هذه الطريقة مشرعاً مفرداً 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 (28).

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 الليشمانية عند استخدام 6 مشرعات عشوائية مختلفة (37).

### 6-9 السواتل الصغيرة **microsatellite**

هي عبارة عن تكرارات ترادفية **tandom repeat** قصيرة يتراوح طولها ما بين 1-6 نوكلوتيدات. تتوزع هذه التكرارات ضمن الدنا النووي وتوجد في جينوم بدائيات النوى **prokaryotic** وحقيقيات النوى **eukaryotic** على حد سواء (38).

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 (39).

مكنت تقنية السوائل الصغيرة **microsatellite** من معرفة تصنيف السلالات المختبرة من خلال معرفة تسلسلات السوائل فيها حيث تملك كل سلالة أعداداً وأطوال سوائل صغيرة معينة خاصة بها، مما مكن من استخدامها لتمييز السلالات عن بعضها البعض. بالتالي سمح تضخيم هذه السوائل، باستخدام مشارع تلتحم مع السوائل الصغيرة، بالحصول على مجموعة من قطع الدنا المضخمة ذات أعداد وأطوال مطابقة لأعداد وأطوال السوائل الصغيرة لأحد السلالات المرجعية المعروفة التصنيف (40).

### PCR-RFLP 7-9

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

تعتمد هذه الطريقة على استخدام إنزيمات التقيد لتقطيع سلسلة الدنا المطلوب تشخيصها إلى قطع صغيرة. واستخرجت إنزيمات التقيد 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 الشداف الناتجة عن المعالجة بأحد إنزيمات التقيد. وبالتالي يسمح ترحيل الشداف الناتجة عن الهضم على الأغار ومقارنة عدد وطول القطع الناتجة مع الناتجة عن دنا سلالات أنواع مرجعية معروفة من طفيليات الليشمانية 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 للشداف الناتجة (43).

استخدم الموقع الجيني لجين **Gp63** بنجاح للتمييز الجيني بين عدد كبير من العزلات التي تنتمي إلى أربعة أنواع هي الليشمانية لينسوني **L.(V.)Lainsoni**، والليشمانية الغويانية **L.(V.)guyanensis**، والليشمانية البيروفية **L.(V.)peruviana**، والليشمانية البرازيلية **L.(V.)braziliensis**. كما تم تمييز كل أنواع الليشمانية 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 **rRNA** (42).

### 8-9 التعدد الشكلي للسلسلة المفردة **Single Strand conformation polymorphism (SSCP)**

سمحت هذه الطريقة بكشف الاختلافات المورثية على مستوى نوكليويتيد واحد بين 15 عزلة من عزلات الليشمانية الدونوفانية في السودان وعند 29 سلالة من سلالات الليشمانية المدارية. تكشف هذه الطريقة الاختلافات الموجودة بين جزيئات الدنا المفردة السلسلة على مستوى نوكليويتيد واحد، حيث تنعكس هذه الاختلافات بحدوث تبدل في حركة الرحلان الكهربائي (28). جرى تطبيق هذه التقنية على ناتج تضخيم المجال **ITS** وتأكيد النتائج التي تم الحصول عليها بإجراء تحديد تسلسل النوكليويتيدات **sequencing** لناتج تضخيم هذا المجال **ITS**.

### 9-9 سلسلة الدنا **DNA Sequencing**

يشير مصطلح تحديد تسلسل نوكليويتيدات الدنا **DNA sequencing** إلى الطرق التي تسمح بمعرفة ترتيب نوكليويتيدات الأدينين، والغوانين، والسيتوزين، والثيامين، المكونة لجزيء الدنا **DNA** وترتيبها ضمن الجزيء. وظهرت الطرق الأولى في هذا المجال في بداية السبعينات من قبل باحثين أكاديميين استخدموا طرقتهم مخبرية تعتمد على الاستشراب (الكروماتوغرافيا) ثنائي البعد. وجرى تطور هذه الطرق وإمكانية الحصول على نتائجها بسرعة كبيرة جداً من خلال تقنيات تحديد تسلسل النوكليويتيدات الحديثة (43).

ثم تطوّرت بعدها هذه الطرق فأصبحت تعتمد على استخدام الأصبغة وأصبح التحليل آلياً، مما جعل طرق تحديد تسلسل نوكليويتيدات الدنا **DNA** أسهل وأسرع. وأصبحت معرفة تسلسل

نوكلويدات الدنا DNA ضرورية، حيث تستخدم الآن في الدراسات والأبحاث الحيوية، وثبتت أهميتها في التشخيص وفي مجالات القضاء والطب الشرعي forensic أيضا كتحديد الأبوة أو نفيها مثلاً.

سمحت هذه الطرق بتحديد تسلسل النوكلويدات في الجينوم لكثير من الحيوانات، النباتات، والمكروبات. وتمتاز هذه التقنية بأنها تشخيصية وسريعة وتستخدم لتحديد نوع طفيلي الليشمانية الخامج بدءاً من العينات السريرية مباشرة، دون الحاجة إلى عزل الطفيلي بالزرع. وتسمح التقانات الحديثة بأتمتة البيانات والنتائج التي نحصل عليها وتحليلها باستخدام برامج خاصة على الحاسوب، كما تسمح بمقارنة هذه النتائج مع مكتبة جينومية وبالتالي معرفة نوع السلالة المختبرة.

تعد هذه الطريقة مهمة لتمييز الدنا الهدف بعد التضخيم فإذا ظهر اختلاف في تسلسل الأسس للدنا المضخم فهذا دليل على وجود طفرة، لذلك جرى استخدام هذه التقنية في تحليل ناتج التضخيم للدنا بهدف تحري الطفرات وتحديد نوع الطفيلي وشرح الآلية الجزيئية للأمراض الوراثية، ويشكل التعرف على تسلسل نوكلويدات الدنا أمراً أساسياً وهاماً في مجال البيولوجيا الجزيئية، حيث يسمح التعرف على تسلسل الجينات لدى الكائنات بما فيها الانسان، مما مكن من حل شيفرة الجينوم البشري. وطورت طرق مختلفة لتحديد هذا التتالي للنوكلويدات (28).

## 10- المعالجة

### أ- معالجات لا دوائية

تعتمد على استخدام الآزوت السائل، أو الفحم الثلجي، أو الأشعة تحت الحمراء، أو استخدام التيار الكهربائي المستمر (الطريقة البغدادية).

### ب- معالجات بالأدوية الكيميائية

تعد مشتقات الانتيموان الخيار العلاجي الأول بينما يستخدم الأمفوتيريسين والبنتاميدين كخيار ثان.

## 10-1 مشتقات الأنتيموان

تعد مشتقات الأنتيموان منذ 60 سنة الخط الأول لعلاج داء الليشمانيات وتشمل مركب **SSG** صوديوم ستيبغليكونات **Sodium Stibogluconate** ومركب **MGA** ميغلومين أنتيمونات **Meglumine antimoniate**. ويتوفر **MGA** تجارياً بشكل حقن وريدية وعضلية تحت اسم **Glucantime** تحتوي كل 5 مل منها 1500 مغ **MGA** ويستخدم في الدول الناطقة باللغة الفرنسية ويتوفر **SSG** تجارياً تحت اسم **Pentostam** ويستخدم في الدول الناطقة باللغة الإنكليزية (44). تمتاز مشتقات الأنتيموان بضعف امتصاصها من قبل الأنبوب المعدي المعوي للإنسان، وبالتالي تكون غير فعالة عند إعطائها فمويًا، مما يستدعي إعطاءها إما حقناً داخل الآفة أو عن طريق الحقن العضلي أو الوريدي.

تستخدم مشتقات الأنتيموان لعلاج الليشمانية الجلدية، حيث يؤدي استخدامها بجرعة عضلية أو وريدية تساوي 20 ملغ/كغ/يوم لمدة 20 يوماً إلى شفاء 94% من المرضى. وسمح استخدام **SSG** بمعالجة الليشمانية الجلدية، بحقنة داخل الآفة الجلدية بجرعة تساوي 50 ملغ/0.5 مل من محلول الدواء تعطى مرة أسبوعياً لمدة 12 أسبوعاً، بالحصول على نتائج مشجعة. هذا ويسبب الحقن للبعوض (الشكل 7) آلاماً أثناء الحقن وبعض التأثيرات الجانبية.

تستخدم مشتقات الأنتيموان أيضاً لعلاج الليشمانية الحشوية، حيث تعطى بجرعة تساوي 40 ملغ/كغ/يوم لمدة 28 يوماً عن طريق الحقن العضلي أو الوريدي.



الشكل 7 : طريقة أخذ العلاج ضمن الآفة (44).

ويمكن أن يؤدي العلاج بمشتقات الأنتيموان إلى ظهور عدد من التأثيرات الجانبية تشمل اضطرابات قلبية- وعائية، واضطرابات كبدية، واضطرابات هضمية، واضطرابات جلدية، واضطرابات كلوية. وتتجلى الاضطرابات القلبية الوعائية بحدوث تسرع قلب بطيني **Ventricular Tachycardia** وذلك عند حقن **MGA** عضلياً بجرعة تساوي 75 ملغ/كغ. كما تم تسجيل ارتفاع في مستويات ناقلات الأمين في المصل خلال المعالجة بمركب **MGA** لذا يجب مراقبة وظائف الكبد خلال المعالجة بمركبات الأنتيموان. هذا وسجلت بعض الحالات النادرة من التأثيرات الجانبية الأخرى كالغثيان والإقياء والتهاب البنكرياس الحاد.

### 10-2 الأمفوتريسين B Amphotericin B

هو مضاد حيوي يعد منذ عام 1960م، الدواء ذو الخيار الثاني لمعالجة داء الليشمانيات. يؤثر هذا المركب بشكل انتقائي على الفطور، والليشمانية والمتقيبات الكروزية **T. cruzi**. ويعزى التأثير الانتقائي لهذا الدواء إلى ألفته العالية للإرغوستيرول، الذي يشكل أهم الستيرويدات في الأحياء الدقيقة السابقة، ولا يوجد في خلايا الثدييات، حيث يعد الكوليستيرول أهم الستيرويدات في خلايا الثدييات. وتختلف حساسية أنواع الليشمانية لهذا المركب ويعود ذلك لاختلاف نمط هذه الستيرويدات ونسبها عند الأنواع المختلفة لليشمانية (45).

يستخدم الأمفوتريسين **B** بأشكال دوائية مختلفة كالحقن الوريدية أو الليبوزومات **Liposomal-AMB**. وتبين الدراسات أن الليشمانية الدونوفانية **L. donovani** أكثر حساسية من الليشمانية الطفلية **L. infantum** لهذا الدواء. وسجلت الدراسات وجود اختلاف في نتائج المعالجة بهذا الدواء ويمكن أن يعود ذلك إلى اختلاف الحمولة الطفيلية **Parasite load** واختلاف الحالة المناعية للمضيف أكثر من ارتباطه باختلاف حساسية الأنواع السابقة لليشمانية للأمفوتريسين **B**. وهو يعطى وريدياً للمصابين بجرعة تساوي 2 ملغ/كغ/ يوم تعطى كل 3 أيام. ويترافق العلاج بالأمفوتريسين **B** مع ظهور بعض الآثار الجانبية، حيث يمكن أن يعاني المعالجين من مشاكل قلبية، وكلوية وارتفاع الضغط الشرياني، وفقر الدم.

### 10-3 البنتاميدين Pentamidine

يعد منذ 40 عاماً الدواء ذا الخيار الثاني لمعالجة الليشمانية الجلدية والليشمانية الحشوية. وعلى الرغم من المحاولات السريرية لاستخدامه في عام 1990 لمعالجة الليشمانية الجلدية في العالم الجديد، فإن هذا الدواء لم يحظ بانتشار واسع كدواء مضاد لليشمانية. ويعود الاستخدام المحدود لهذا الدواء لإمكانية ظهور مقاومة له عند معالجة حالات الليشمانية الحشوية، حيث انخفض مؤشر الاستجابة لهذا الدواء في الهند من معدل شفاء تجاوز 95% في بداية الثمانينيات من القرن العشرين إلى معدل شفاء أقل من 70% خلال العقد الأخير، بينما لم تظهر أي مقاومة عند استخدامه لمعالجة الليشمانية الجلدية.

تعتمد آلية تأثير البنتاميدين كمضاد لليشمانية على تثبيط اصطناع عديدات الأمين **Polyamine biosynthesis** من جهة وعلى تأثيره على كمون الغشاء الداخلي للمتقدرات **Mitochondria** من جهة أخرى.

يعطى هذا الدواء، بجرعة تعادل 2-4 ملغ/كغ/يوم، مرة كل ثلاثة أيام لمدة شهرين. وبترافق استعماله مع ظهور عدد من الآثار جانبية كارتفاع الضغط. هذا ولا يعطى البنتاميدين لمرضى الصرع (44).

### 10-4 أدوية أخرى

كما استخدمت مجموعة من الأدوية الأخرى مثل البارومومايسين الذي استخدم كمرهم لعلاج الإصابات الجلدية، أو الملتيفوزين، أو السيتاماكين، أو الآزولات، أو الألبورينول. في الحقيقة بقي الاستخدام السريري للأدوية السابقة محدوداً ولم تستطع أن تحل مكان مركبات الانتيموان أو الأمفوتيريسين أو البنتاميدين.

# الدراسة العملية

## 1-مبررات البحث

تكتسب معرفة نوع الليشمانية المسبب للإصابات الجلدية أهمية كبيرة حيث يوجد اختلاف واضح بين وبائيات انتشار الليشمانية المدارية، التي يشكل الإنسان خازناً لها وتنتقل من إنسان إلى إنسان آخر، ووبائيات انتشار الليشمانية الكبرى التي تشكل الحيوانات كالفواض خازناً لها وتنتقل من الحيوان إلى الإنسان، ووبائيات انتشار الليشمانية الطفيلية التي تشكل الحيوانات كالكلاب خازناً لها وتنتقل من الحيوان إلى الإنسان. تؤدي الفروق الوبائية السابقة أيضاً إلى اختلاف من حيث الطرق المستخدمة للمكافحة والوقاية، مما يكسب تعيين واستعراف نوع الليشمانية المنتشر أهمية كبيرة ويسمح للسلطات الصحية باتخاذ الطرق الوقائية المناسبة. ونظراً لانتشار كل من الليشمانية المدارية والليشمانية الكبرى والليشمانية الطفيلية في مناطق متعددة من سورية ولعدم وجود دراسات منشورة حول تحديد أنواع الليشمانية المنتشرة في محافظة اللاذقية فقد قررنا إجراء هذه الدراسة.

## 2-هدف البحث

تهدف هذه الدراسة إلى تنميط أنواع الليشمانية المسببة لداء الليشمانيات الجلدي في محافظة اللاذقية. كما تهدف هذه الدراسة إلى تقصي حساسية ذراري الليشمانية المعزولة للأدوية المستخدمة لعلاجها. ودراسة حساسية طريقة ITS1-PCR في تشخيص وتنميط الطفيليات المسؤولة عن داء الليشمانيات الجلدي في محافظة اللاذقية.

تمت هذه الدراسة بالتعاون بين مركز الدراسات الوبائية والبيولوجية لطفيليات الليشمانية وهيئة النقانة الحيوية بدمشق ومستشفى الأسد الجامعي في اللاذقية والمركز التخصصي لليشمانية والأمراض الطفيلية باللاذقية.

## 3-المواد والطرق

### 3-1 جمع العينات

جرى أخذ العينات من 150 مريضاً من مراجعي المركز التخصصي لليشمانية والأمراض الطفيلية في اللاذقية التابع لوزارة الصحة، وجرى اختيار المرضى من المراجعين الذين يشك

بإصابتهم بالليشمائية الجلدية وفقاً للمظاهر السريرية. كما جرى جمع العينات من المرضى خلال الفترة الواقعة بين بداية شهر كانون الثاني 2013 ونهاية شهر حزيران 2013. هذا وجرى أثناء جمع العينات اعتماد الاستمارة التالية:

جامعة دمشق

كلية الصيدلة

دراسة وبائية حول انتشار طفيليات الليشمائية في محافظة اللاذقية

- رقم الحالة:  
-اسم المريض:  
-العنوان الدائم:  
-العنوان الحالي:  
-العمر:  
-التاريخ:  
-اسم الأب:  
-اسم الأم:  
-رقم الهاتف:  
-المهنة:

منطقة الإصابة	الوجه	اليدين	القدمين	الصدر	الظهر
عدد الإصابات					
قطر الآفة					

- تاريخ بدء ظهور الآفة:  
-عدد أفراد الأسرة:  
-مكان تواجد المصاب خلال الست أشهر الأخيرة:  
-هل يوجد مستنقعات مكشوفة في مكان الإقامة:  
-كثافة حشرية:  
-قوارض ----- فئران ----- جردان -----  
-كلاب شاردة-----  
-تاريخ الفحص المباشر: نتيجة الفحص المباشر:  
-تاريخ الزرع: نتيجة الزرع:  
-نتيجة الـ PCR:

### 2-3 عزل الطفيليات

#### أ- أخذ العينة

نظفت الآفة الجلدية وما حولها بالكحول 70% عدة مرات وتركت حتى تجف. وأخذ السائل المصلي وقطرات الدم المتحررة نتيجة إدخال النهاية الحادة لمشرط عقيم في قاعدة الإصابة وتحريكه حتى تتحرر الطفيليات وتخرج مع السائل المصلي وقطرات الدم. سحب السائل المصلي وقطرات الدم بممص باستور جرى تعقيمه بفرن باستور مدة نصف ساعة بدرجة حرارة 220 °C.

#### ب- الدراسة المجهرية المباشرة

مدت العينة على صفيحة زجاجية نظيفة تماما وتركت حتى تجف تماماً، وثبتت بالميثانول مدة دقيقة. ثم غمرت الصفيحة السابقة بملون غيمزا لمدة 5 دقائق وغسلت بالماء المقطر وتركت حتى تجف. فحصت العينة، بعد ذلك، بالمجهر الضوئي بواسطة العدسة الغاطسة بالتكبير  $\times 100$ .

#### ج- تحضير وسط (N.N.N) Novy-Mac-Neal-Nicolle-Medium

وسط N.N.N هو وسط ثنائي الطور يجري تحضيره بحل 3.5 غ آغار و 1.6 غ كلوريد الصوديوم في 250 مل من الماء المقطر في حمام مائي مع التحريك المستمر. يوزع الوسط السابق في أنابيب زجاجية بمقدار 5 ميلي ليتر في كل أنبوب. نعقم هذه الأنابيب بالصاد الموصل بدرجة حرارة 120°C، والضغط 1.5 بار، لمدة 20 دقيقة ثم نتركها حتى تنخفض درجة حرارتها إلى 50 °C.

نحصل على حوالي 20 مل من دم أرنب ببزله من القلب بعد تخدير الأرنب ونضعه في علبة زجاجية عقيمة تحوي على حبيبات زجاجية لنزع الفيبرين حيث يسمح التحريك بشكل دوراني بنزع الفيبرين من الدم. نأخذ دم الأرنب منزوع الفيبرين ونضيف له بنسولين وستربتومايسن بمقدار 100 وحدة دولية/مل دم كما نضيف 5- فلوروسيتوزين بمقدار 50 مكغ/مل دم.

يجري تحضير الوسط ثنائي الطور تحت الخيمة العقيمة بإضافة 0.5 مل دم أرنب إلى كل أنبوب من أنابيب الآغار التي تم تحضيرها، درجة حرارتها 50 °C، ومن ثم تمزج جيداً مع مراعاة عدم تشكل فقاعات هوائية. توضع الأنابيب بعد ذلك بشكل مائل وتترك لتبرد وتتصلب ثم تحفظ أخيراً في البراد بالدرجة +4°C إلى حين الاستعمال. ويجب ترك الأنابيب مدة 24 ساعة قبل استخدامها. يضاف لكل أنبوب، قبل الاستخدام مباشرة، من وسط RPMI-1640 ويتم ذلك تحت خيمة الزرع.

جرى زرع العينات، بعد أخذها مباشرة، بوضعها في أحد أنابيب وسط N.N.N ومزجها مع قطرات الوسط الذي تمت إضافتها قبل الزرع. تزرع العينات قرب مصباح بنزن أو تحت خيمة الزرع. وتحضن الأوساط المزروعة الحاوية على الطفيليات بدرجة حرارة 26°C. تمت مراقبة الأنابيب يومياً من خلال مراقبة التبدلات التي تطرأ على الطفيليات من حيث الشكل والحركة والعدد. ويجري نقل الطفيليات النامية إلى أوساط N.N.N جديدة كل أسبوع، أو وسط RPMI-1640.

#### هـ- الاستنبات على الوسط السائل RPMI-1640 وحيد الطور

استخدم المحلول الجاهز لوسط RPMI-1640 الذي صنع من شركة SIGMA (German) على شكل عبوة سعتها 500 مل وتمت إضافة مصل عجل جنيني عطلت متمته بالحرارة بدرجة 56 °C مدة 30 دقيقة بمقدار 10% قبل الاستخدام مباشرة.

يعقم الوسط بالترشيح باستخدام مرشح 0.22 ميكرومتر من شركة Sartoriusstedim وبعدها يوزع الوسط العقيم في حوجلات سعتها 250 مل بمعدل 50 مل من الوسط لكل منها. يستخدم هذا الوسط لتكثير الطفيليات التي نمت في أنابيب الزرع الحاوية على وسط NNN، حيث تنقل الطفيليات منه إلى وسط RPMI-1640.

يجري حضن الوسط بدرجة حرارة 26°C ومراقبة الطفيليات يومياً في كل حوجلة من حيث العدد والشكل والحركة بواسطة المجهر المقلوب. ويجري بعدها تثقيف 5 مل من الوسط بسرعة 5000

دورة في الدقيقة لمدة 5 دقائق ورمي الطافي وحفظ الرسابة الحاوية على الطفيليات في درجة حرارة -80°C إلى حين عزل الدنا.

### 3-3 عزل الدنا من العينات السريرية

استخدمت عتيدة **GeneGET Genomic DNA** من شركة **Thermo Scientific** لعزل الدنا من العينات المرضية التي جرى جمعها من المرضى والمحافظة بدرجة حرارة -80°C. تم اتباع البروتوكول الموصى به من قبل الشركة، حيث سمح استخلاص الدنا من 20 مليون مشيقة بالحصول على 70-80 نانوغرام/مكرو لتر.

استخدم تفاعل **PCR** لتضخيم الدنا الموجود في كل عينة من العينات المرضية المستخدمة في البحث، حيث يسمح تضخيم المجال **ITS1** في الدنا الجينومي بتشخيص نوع الليشمانية المسببة. ولقد جرى العمل على عتيدة الـ **PCR** من شركة **Euroclone, GENOMICS** التي تحتوي خمسة أنابيب. يحتوي الأنبوب الأول 200 مكل من إنزيم **Euro Taq** بتركيز 5 وحدات/مكل، ويحتوي كل من الأنبوبين الثاني والثالث 1.5 مل من دائرة الـ **PCR** بتركيز  $10\times$ ، بينما يحوي كل من الأنبوبين الرابع والخامس 1.5 مل من **Mgcl2** بتركيز 50 ميلي مول. ويجري حفظ هذا الطاقم بدرجة حرارة -20°C.

يهدف تفاعل **ITS1-PCR** إلى تضخيم الميدان **ITS1**، مما يسمح بتشخيص وتنميط طفيليات الليشمانية على مستوى النوع. ويجري التضخيم باستخدام المشرعين لليشمانية المدارية:

**LITSR(5-CTGGATCATTTTCCGATG-3)**

**L5.8S(5-TGATACCACTTATCGCACTT-3)**

جرى شراء هذين المشرعين من شركة **Fermentas** فرع **German, LIFE SCIENES**، في حين يبلغ عدد أسس المشرع الأول 18 أساس ووزن جزيئي 5481 غ/مول، يبلغ عدد أسس المشرع الثاني 17 أساس ووزن جزيئي 5299 غ/مول.

جرى تطبيق بروتوكول التضخيم المعدل من قبل جمانة محمود عام 2011 (58) حيث بلغ حجم محلول التضخيم النهائي 50 ميكرو لتر ويحتوي 5 مكل دائرة الـ PCR بتركيز  $10 \times$ ، 5 مكل من dNTPs بتركيز 2 ميلي مول، 1.5 مكل من  $MgCl_2$  بتركيز 50 ميلي مول، 5 مكل من كل مشرع بتركيز 10 ميكرومول، 2 مكل تحوي 5 وحدات من **Taq polymerase**، وجرى إتمام الحجم إلى 50 مكل بإضافة ماء الـ PCR، ومن ثم التضخيم باتباع البرنامج الحراري نفسه بإجراء تمسخ أولي بدرجة حرارة  $95^\circ C$  لمدة دقيقة ثم التحام بدرجة حرارة  $53^\circ C$  لمدة 30 ثانية ثم استطالة بدرجة حرارة  $72^\circ C$  ولمدة دقيقة ثم استطالة نهائية بدرجة حرارة  $72^\circ C$  لمدة 6 دقائق وعدد الدورات 35 دورة.

جرى تحليل الميدان **ITS1** المضخم بواسطة الـ **RFLP**، حيث استخدم إنزيم **Hae III** من شركة **Fermentas** فرع **(England) LIFE SCIENCES** من أجل هضم ناتج تضخيم الميدان **ITS1**. وتتألف عتيدة الإنزيم من ثلاثة أنابيب تشمل أنبوب يحوي الإنزيم بحجم 300 مكل بتركيز 10 وحدات /مكل، وأنبوبين يحوي كل منهما 1 مل من الدائرة **R** بتركيز  $10 \times$  وهذه الدائرة تتألف من 10 ميلي مول تريس-**HCl** بدرجة **pH=8.5**، و 10 ميلي مول من كلور المغنزيوم، و 100 ميلي مول كلور البوتاسيوم **KCl**، و 0.1 مل/مغ **Bovine BSA** (**Serum Albumin**). وتؤدي هذه الدائرة إلى هضم كامل للدنا بنسبة 100%. تم اتباع تعليمات البروتوكول الموصى به من الشركة عند إجراء الهضم بالإنزيم، ثم تم ترحيل 10 ميكرو لتر من ناتج الهضم على هلامة الأغاروز 2%.

جرى ترحيل الدنا على هلامة آغاروز 2% لإظهار ناتج تضخيم **ITS1 PCR**. ويتطلب الرحلان توفر دائرة الـ **TBE** بتركيز  $5 \times$ ، وآغاروز لتحضير هلامة الآغاروز، ومحلول **TEMED**، والملون.

### 3-4 تحضير محاليل ودوائى الرحلان

#### 3-4-1 دائرة TBE ( Tris Borate EDTA Buffer )

جرى تحضير 1 لتر من دائرة TBE (5×) بوزن 54 غ من مادة Tris base من شركة promega (USA)، و 27.5 غ من حمض البور من شركة USA – USB. تحل المساحيق السابقة بجزء من الماء المقطر ثم يضاف 20 مل من محلول EDTA بتركيز 0.5 مول و pH=8، ومن ثم يكمل الحجم بالماء المقطر إلى 1 لتر. ويجب التحقق من درجة pH=8، وإعادة ضبطها عند الحاجة بمحلول حمض الكلوريد أو ماءات الصوديوم 1 نظامي.

يجري تحضير 1 لتر من محلول EDTA ذو التركيز 0.5 مول، ودرجة ال pH=8 بوزن 186.12 ملغ من EDTA من شركة USB وحلها بجزء من الماء المقطر، لا يتم الانحلال حتى يتم تعديل ال pH=8 بإضافة قطرات من NaOH 1 نظامي، ثم يكمل الحجم بالماء المقطر إلى الحجم المطلوب.

#### 3-4-2 تحضير الملون

يتألف الملون من 0.25% من أزرق البروموفينول من شركة USB، و 0.25% إكزيلين سيانول من شركة IBI (International Biotechnology Inc)(U.S.A)، و 25% فيكول من شركة Merk (Germany). يجري تحضير 1 مل من الملون بوزن 2.5 ملغ من أزرق البروموفينول في أنبوب إيبندورف، و 2.5 ملغ من إكزيلين سيانول في أنبوب إيبندورف آخر، و 25 ملغ فيكول 400 في أنبوب إيبندورف جديد. نضيف 200 ميكرو لتر ماء ال PCR إلى أنبوب الكزيلين، ثم نضيف محلول الكزيلين الناتج فوق البروموفينول ونحرك جيداً. نضيف 800 ميكرو لتر من ماء ال PCR إلى أنبوب الفيكول ونخلطه جيداً وبشكل تدريجي لأنه صعب الذوبان، حيث يضاف الماء فوق مسحوق الفيكول. ونضيف بعد ذلك محلول الكزيلين - البروموفينول إلى محلول الفيكول ونخلط جيداً حتى امتزاج المحاليل ثم يوضع عليها لصاقة تدل على اسم المحلول وتاريخ التحضير ويحفظ الأنبوب في البراد.

### 3-4-3 الرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز 2% في دائرة $TBE \times 0.5$ :

استعمل جهاز الرحلان الأفقي حيث نظف حامل الهلامة أولاً ومسح بالميتانول ومن ثم ثبت حامل الهلامة في حوض الترحيل ووضع المشط تمهيداً لصب الهلامة حيث يتسع حامل الهلامة لحوالي 50 مل من الهلامة.

#### 4-4-3 تحضير الهلامة

يجري تحضير 100 مل من محلول هلامة الأغاروز 2% بإذابة 2 غ من الأغاروز في علبه زجاجية سعة 500 مل، في 100 مل محلول يتألف من 10 مل من دائرة **TBE** ، 90 مل ماء مقطر ويوضع محرك مغناطيسي بداخلها ويوضع غطاء العبوة دون شد ثم توضع العبوة الزجاجية في بيشر يحوي ماء يغلي حتى الانحلال التام أي حتى يصبح المحلول شفافاً تماماً. نخرج العبوة الزجاجية من الحمام المائي وتترك حتى تنخفض درجة الحرارة إلى  $65^{\circ}\text{C}$ ، ثم يصب المحلول في حامل الهلامة الذي جهز سابقاً ومن ثم نضيف له بروميد الايتيديوم بمقدار 1 مكرو لتر لكل 10 مل ويترك حتى يبرد المحلول ويتهلم. عندما يبرد الأغاروز ويتهلم تماماً ينزع المشط بلطف وبشكل عمودي حتى لا تتخرب الآبار ثم ينقل الهلام إلى حوض الرحلان، حيث تغمر الهلامة بدائرة  $TBE \times 0.5$ .

يجري حقن العينات في الآبار بعد مزج 10 مكرو لتر من ناتج تضخيم دنا كل عينة مع 2 مكرو لتر من الملون في أنبوب إيبندورف والمزج جيداً، ومن ثم حقن المزيج بواسطة رأس ميكروبييت في البئر المناسب. ثم يجري حقن 10 مكل من **DNA Lader 50 bp**، و 10 مكل من **DNA Lader 100 bp**. وبعد انتهاء الحقن يتم توصيل جهاز الرحلان إلى تيار كهربائي ويتم ضبط التيار على 100 فولط وتسجل شدة التيار الموافقة بالميلي أمبير ويجري التوصيل لمدة ساعة ويكون الرحلان بشكل أفقي. عند انتهاء الترحيل يتم تطهير العصابات بوضع الهلامة في جهاز الأشعة فوق البنفسجية **UV**، ثم يجري تصوير الهلامة.

### 3-5 فعالية الأدوية على الليشمانية في الزجاج

جرى شراء أمبولات جاهزة من الغلوكانتيم 1500 ملغ/5 مل، والبننتوستام تركيزها 1600 ملغ/5 مل، والأمفوتيريسين B تركيزها 140 ملغ/5 مل، من شركة (France) Sanofi Aventis وجرى تحضير مجموعة من المحاليل الممددة من كل دواء.

جرى تحضير 12 مل من وسط RPMI-1640 يحوي كل 1 مل منها 5×610 من مشيقات طفيليات الليشمانية المدارية في الطور اللغاريتمي. وقمنا بتوزيع الوسط السابق بعد المزج جيداً على آبار صفائح الزرع من شركة (Germany) cell star وتحوي 12 بئراً، بمقدار 975 مكل في كل بئر.

خصص بئر للشاهد وبئر لكل تركيز من التراكيز المختلفة لكل دواء من الأدوية المدروسة. وقمنا بإضافة 25 مكل من الإيتانول للبئر الشاهد كما قمنا بإضافة 25 مكل من محلول الغلوكانتيم ذي التركيز 160 مكغ/مل و محلول الغلوكانتيم ذي التركيز 320 مكغ/مل و محلول الغلوكانتيم ذي التركيز 420 مكغ/مل و محلول الغلوكانتيم ذي التركيز 600 مكغ/مل إلى بئر الزرع فنحصل على التراكيز النهائية التالية في الآبار 4، 8، 10.5، 15 مكغ/مل، على التوالي. وكذلك الأمر بالنسبة لدواء البننتوستام قمنا بإضافة 25 مكل من محلول البننتوستام ذي التركيز 180 مكغ/مل ومحلول 350 مكغ/مل ومحلول 450 مكغ/مل ومحلول 700 مكغ/مل إلى بئر الزرع للحصول على التراكيز النهائية التالية في الآبار 4.5، 8.75، 11.25، 17.5 مكغ/مل، على الترتيب. كذلك بالنسبة للأمفوتيريسين قمنا بإضافة 25 مكل من محلول الأمفوتيريسين ذي التركيز 2 مكغ/مل ومحلول 2.5 مكغ/مل ومحلول 3 مكغ/مل ومحلول 3.5 مكغ/مل إلى بئر الزرع للحصول على التراكيز النهائية التالية في الآبار 0.05، 0.0625، 0.075، 0.0875 مكغ/مل، على الترتيب.

تحضن آبار الزرع السابقة بدرجة حرارة 37°C لمدة 24 ساعة ثم نقوم بمقايسة عيوشية الخلايا Viability بواسطة عتيدة Cell proliferation kit لشركة Roche.

### مقايسة عيوشية الخلايا Viability بواسطة عتيدة Cell proliferation kit

تعتمد المعايرة على انشطار أملاح التترازوليوم XTT ذات اللون الأصفر نتيجة استقلابها من قبل الخلايا الحية، مما يؤدي إلى تشكل صبغة برتقالية اللون. لا تتشكل الصبغة البرتقالية إلا بوجود الخلايا الحية وترتبط شدة اللون المتشكل بعدد الخلايا الحية، أو بمقدار فعالية إنزيمات نازعة الهيدروجين المتقدرية. وتجري قراءة الامتصاصية في الوسط المائي بواسطة **ELISA**.

تتألف العتيدة من 25 مل من كاشف مؤلف من محلول يحوي XTT بتركيز 1مغ/مل، 0.5 مل من الكاشف الرابط للإلكترونات **electron reagent** الذي يتألف من محلول لمركب N - ميتيل دي بنزوبيرازين ميتيل سلفات بتركيز 0.383 مغ/مل في دائرة فسفات PBS عقيم. تمتاز مكونات العتيدة جميعها بثباتها في درجة حرارة تتراوح بين -15 إلى -25°C. هذا ويجب حماية مكونات العتيدة من الضوء كما يجب تجنب التجميد وفك التجميد المتكرر.

ينطلب إجراء المقايسة فك تجميد الكاشف XTT والكاشف الإلكتروني مباشرة قبل المعايرة بوضعهما في حمام مائي بدرجة حرارة 37°C مع التحريك بهدوء وحتى نحصل على محلول صاف. ثم نمزج 5 مل من الكاشف XTT مع 0.1 مل من الكاشف الإلكتروني فنحصل على محلول كاف لإجراء المقايسة في 96 بئر.

#### ب- خطوات العمل

يجري العمل باستخدام صفائح اليزا تحتوي 96 بئراً. يخصص بئرين للعينات الشاهدة غير المعالجة بأي دواء وبئرين لكل تركيز من التراكيز الأربعة المنتقاة لكل دواء. يضاف 100 مكل من وسط الزرع الحاوي على عدد محدد من الطفيليات في كل بئر من آبار الصفيحة. نضيف بعدها 50 مكل من مزيج الكاشفين السابقين (XTT مع الكاشف الإلكتروني) لكل 100 ميكرو لتر من وسط الزرع ونحضن صفيحة الاليزا لمدة 4 ساعات بدرجة حرارة 26°C. ونقوم بعدها بقراءة امتصاصية اللون المتشكل بواسطة قارئ الاليزا بموجة طولها 450 نانومتر مقابل موجة بطول مرجعي 690 نانومتر. ويجري حساب النسبة المئوية للعيوشية في كل بئر من آبار الزرع المعالجة بتركيز مختلف من الدواء بالمقارنة مع الشاهد وذلك وفقاً للمعادلة التالية:

% للعيوشية = (امتصاصية البئر الحاوي على الدواء / امتصاصية البئر الشاهد)  $\times 100$

ه- نوعية وحساسية الطرق المستخدمة في الدراسة

جرى حساب الحساسية **Sensitivity** والنوعية **Specificity** وفقاً للمعادلات التالية:

$$\text{Sen} = \text{TP} / (\text{TP} + \text{FN}) \times 100$$

$$\text{Spe} = \text{TN} / (\text{TN} + \text{FP}) \times 100$$

حيث تمثل **TP** العينات الإيجابية الحقيقية، و**FP** العينات الإيجابية الكاذبة وهي العينة السلبية التي أعطت نتيجة إيجابية، و**TN** العينات السلبية الحقيقية، و**FN** السلبية الكاذبة وهي العينة الإيجابية التي أعطت نتيجة سلبية.

#### 4- النتائج

أخذت العينات من 150 مريضاً من المرضى المراجعين للمركز التخصصي للليشمانية والأمراض الطفيلية في محافظة اللاذقية ويشك بإصابتهم بالليشمانية الجلدية حسب المظاهر السريرية التي ظهرت عليهم. جرى جمع العينات خلال الفترة الواقعة من بداية شهر كانون الثاني 2013 وحتى نهاية شهر حزيران 2013. وجرى انتقاء المرضى الذين تأكدنا أن إصابتهم قد اكتسبت في محافظة اللاذقية وريفها حسب شروط أخذ العينات وشروط استبعاد عينات أخرى.

#### 4-1 توزع الإصابات في المناطق المختلفة لمحافظة اللاذقية

تشير ملاحظتنا أثناء التواجد في مركز الليشمانية في اللاذقية إلى أن المرضى موزعون في أنحاء اللاذقية جميعها ويثبت الجدول 3 ذلك من خلال إظهاره للمناطق المختلفة من محافظة اللاذقية التي يقطن فيها المرضى الذين خضعوا لدراستنا.

جرى تصنيف المرضى الذين جمعت منهم العينات وفق أرقام وجرى جمع المعلومات عنهم بالتفصيل وجرى التأكد من أن هؤلاء المرضى قد اكتسبوا إصابتهم في مناطق السكن نفسها الواردة في الجدول 3. تشكل محافظة ادلب امتداداً طبيعياً لمحافظة اللاذقية وتمتلك البيئة نفسها، ونظراً لمراجعة عدد كبير من المرضى القاطنين في ادلب لهذا المركز فقد انتقينا بشكل عشوائي 30 مريضاً من ثلاثة مناطق من محافظة إدلب وهي بداما، والجانودية، وجسر الشغور. ولقد أكد

المرضى أن إصابتهم بدأت في مناطقهم قبل قدومهم إلى اللاذقية. وجرى سؤال المرضى جميعهم في ما إذا كانوا يقطنون قريباً من مستنقعات أو تتواجد في المنطقة قوارض أو كلاب شاردة، فكان جوابهم بالنفي.

الجدول 3: المناطق المختلفة التي يقطن فيها المرضى الذين شاركوا في دراستنا.

المحافظة	المنطقة	عدد العينات
اللاذقية	مدينة اللاذقية	10 عينات
اللاذقية	الحفة	10 عينات
اللاذقية	القسطل	10 عينات
اللاذقية	كسب	10 عينات
اللاذقية	جبله	10 عينات
اللاذقية	سلمى	10 عينات
اللاذقية	المزيرعة	10 عينات
اللاذقية	رأس البسيط	10 عينات
اللاذقية	أم الطيور	10 عينات
اللاذقية	قسمين	10 عينات
اللاذقية	صلنفة	10 عينات
اللاذقية	كفرية	10 عينات
إدلب	بداما	10 عينات
إدلب	جسر الشغور	10 عينات
إدلب	الجانودية	10 عينات

#### أ- توزيع الإصابات وفقاً للجنس والعمر

شكل الذكور 48.66% من المصابين (الجدول 4) وشكلت الإناث 51.33% منهم. وشكل الأطفال الذين تقل أعمارهم عن عشر سنوات 36.66% من مجموع المصابين وتعد الشريحة الأكثر إصابة بين الشرائح العمرية المختلفة، واحتلت الشريحة العمرية التي تضم الأشخاص الذين تتراوح أعمارهم بين 21-30 عاماً المرتبة الثانية بين الشرائح العمرية الأكثر إصابة بالليشمانية. بينما احتلت الشرائح العمرية الأخرى المختلفة، والتي أظهرت درجات متقاربة من النسب المئوية للمصابين بالليشمانية، المرتبة الثالثة.

الجدول 4: توزع المرضى وفقاً للجنس والشرائح العمرية.

الفئات العمرية بالأعوام	مجموع المصابين	النسبة المئوية	الذكور	الإناث	ريات المنزل
10-0	55	36.66%	25	30	0
20-11	21	14%	12	9	0
30-21	37	24.66%	20	10	7
40-31	17	11.35%	8	4	5
41≤	20	13.33%	8	1	11
المجموع	150	100%	73	54	23

ب- عدد القرحة المشخصة وقطرها وعمرها لدى مجموع المرضى

عانى 70 مريضاً من قرحة واحدة بينما عانى باقي المرضى من عدة قرحات تراوحت بين 2- 7 قرحات ويظهر الجدول 5 عدد القرحات لدى المرضى الذين خضعوا لهذه الدراسة.

الجدول 5: عدد القرحات لدى المرضى الذين خضعوا للدراسة.

عدد القرحات	عدد المرضى		
	الاجمالي	سليبو الفحص المباشر	سليبو الزرع
قرحة واحدة	70	20	30
قرحتين	43	13	15
3 قرحات	10	5	4
4 قرحات	10	2	3
5 قرحات	7	1	2
6 قرحات	8	0	1
7 قرحات	2	0	0

هذا واختلاف قطر القرحات أيضاً بشكل كبير حيث عانى 55 مريضاً من قرحات لا يتجاوز قطرها 1 سم، وعانى 45 مريضاً من قرحات يتراوح قطرها بين 1- 2 سم. وعانى 25 مريضاً

من قرحات يتراوح قطرها بين 2-3 سم، وعانى 18 مريضاً من قرحات يتراوح قطرها بين 3-4 سم، وعانى 4 مريضاً من قرحات يتراوح قطرها بين 4-5 سم، وعانى 2 مريضاً من قرحات يتراوح قطرها بين 5-6 سم، وعانى 1 مريضاً من قرحات يتراوح قطرها بين 6-7 سم.

الجدول 6: قطر القرحات المشخصة لدى المرضى الذين خضعوا للدراسة.

عدد المرضى			قطر القرحات
سليبيو الزرع	سليبيو الفحص المباشر	الاجمالي	
22	14	55	أقل من 1 سم
17	15	45	2-1 سم
5	5	25	3-2 سم
8	4	18	4-3 سم
1	2	4	5-4 سم
1	1	2	6-5 سم
1	0	1	7-6 سم

وقد اختلفت عمر الآفات المشخصة لدى مرضى دراستنا بين أقل من عام إلى عامين ويوضح الجدول 7 عمر الآفات المشخصة في دراستنا.

الجدول 7: عمر القرحات لدى المرضى الذين خضعوا للدراسة.

عدد المرضى			عمر القرحات
سليبيو الزرع	سليبيو الفحص المباشر	الاجمالي	
24	14	85	أقل من نصف عام
12	10	30	من نصف عام إلى عام
10	9	20	عام إلى 1.5 عام
9	8	15	1.5 عام إلى عامين

#### 4-2 تمييز الذراري المسؤولة عن الإصابات الجلدية

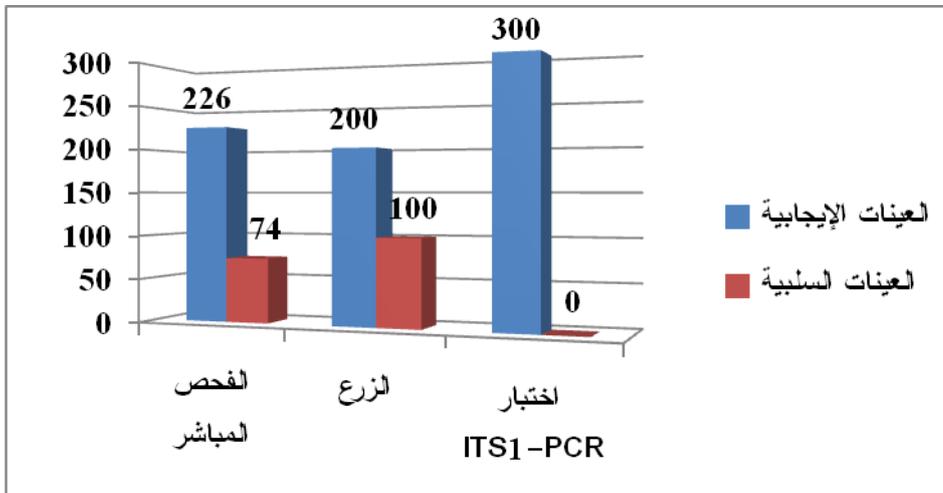
شملت هذه الدراسة 300 عينة أخذت من المرضى الذين خضعوا لهذه الدراسة حيث عانى المرضى من عدد من الإصابات الجلدية تتراوح بين إصابة واحدة إلى سبع إصابات.

##### أ- نتائج الفحص المجهرى

تشكل رؤية الليشمانات الدليل الوحيد على إيجابية اللطاخة التي يتم تلويها بملون غيمزا ويستغرق هذا الاختبار مدة تتراوح بين 30-45 دقيقة. أظهرت نتائجنا إيجابية لطاغات 226 عينة من العينات الـ300 المختبرة (الشكل 8). وبالتالي شخص الفحص المجهرى 75.33% من العينات فقط، حيث لم يستطع تشخيص 74 عينة من العينات المختبرة.

يبين الشكل 8 نتائج اختبار الفحص المبار للعينات المدروسة وكذلك نتائج الزرع واختبار

##### .ITS1-PCR



الشكل 8 : نتائج اختبار كل من الفحص المجهرى المباشر للعينات، والزرع، وITS1-PCR.

##### أ- نتائج الزرع

جرت مراقبة المزارع يومياً، بدءاً من اليوم الثالث للزرع، للتأكد من إيجابية زرع العينات. لم يجر الحكم على سلبية الزرع لأي عينة قبل مرور ثلاثة أسابيع على زرع العينات. وتعتمد إيجابية

الزرع على رؤية المشيقات إما بواسطة المجهر المقلوب مباشرة أو بفحص قطرة من وسط الزرع بالمجهر الضوئي. وبينت نتائج زرع العينات على وسط NNN (الشكل 8) إيجابية زرع 200 عينة وبالتالي تمكن الزرع من تشخيص 66.66% من العينات. وبينت نتائجنا إيجابية الزرع لدى 4 عينات كانت سلبية الفحص المباشر بينما نتج 10 عينات إيجابية الفحص المباشر وكانت سلبية بالزرع. وبالتالي استطاع الفحص المباشر والزرع تشخيص 230 حالة أي 76.66% من الحالات، في حين كانت الإيجابية المشتركة في الاختبارين 196 عينة من أصل 300 عينة مختبرة أي 65.33%، في حين كانت عدد العينات التي أعطت نتائج سلبية مشتركة في الاختبارين السابقين 70 عينة من أصل 300 عينة مختبرة أي 23.33%.

في الحقيقة جرى التأكد من تشخيص الحالات التي أظهر الفحص المباشر والزرع سلبيتها، من خلال صفات الآفات وفعالية علاجها بالبنتوستام. ولقد بينت المتابعة أن هذه الآفات ظهرت منذ أكثر من عام. كما بينت نتائج معالجتها بالأدوية المضادة لليشمانية استجابتها الجيدة للعلاج حيث أدى هذا العلاج إلى شفاء معظم الحالات.

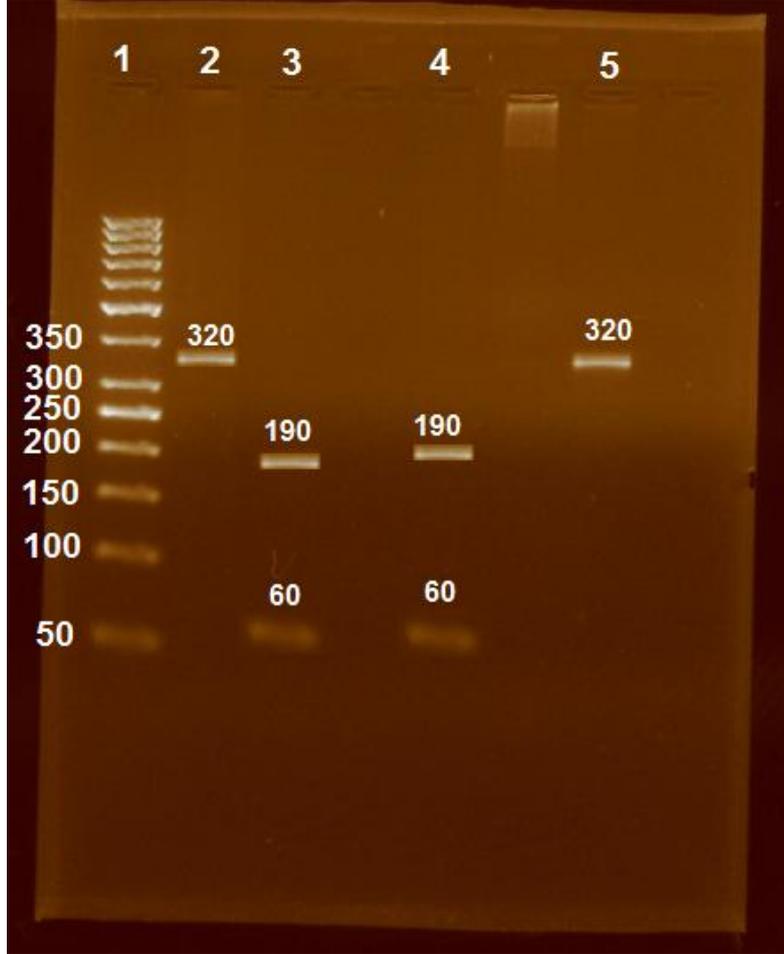
الجدول 8: نتائج تطبيق الاختبارات على العينات 300 المأخوذة.

الاختبار	العينات الإيجابية	العينات السلبية	ملاحظات حول العينات السلبية
فحص مباشر	226	74	كان زرع 4 عينات منها إيجابياً
زرع	200	100	كان الفحص المباشر ل 10 عينات منها إيجابياً
مباشر وزرع	230	70	
ITS1-PCR	300	0	لم تعط أي عينة نتيجة سلبية

#### ب- نتائج الـ ITS1-PCR

تعتمد إيجابية هذا التفاعل (الشكل 9) على ظهور عصابة بطول 320bp تقريباً تشير إلى أن الطفيليات تنتمي إلى جنس الليشمانية. ويبين هضم هذه العصابة باستخدام إنزيمات قطع مختلفة (Hae III) أن العينات المهضومة، التي يظهر رحلانها وجود عصابتين بحجم 190

و60 زوج أساس، تنتمي إلى نوع الليشمانيا المدارية. ويستغرق هذا الاختبار حوالي الساعتين والنصف.



الشكل 9: الرحلان الكهربائي لعصابات عينتين مختلفتين إيجابيتين بعد التضخيم (قبل الهضم وبعد الهضم). خصص البئر 2 و3 للعينات الأولى والبئر 4 و5 للعينات الثانية. يمثل البئر 1 سلم دنا 50bp (معياري الدنا)، ويمثل البئر 2 و5 ناتج تضخيم عينتين إيجابيتين، حيث تظهر عصابة حجمها 320bp، ويمثل البئر 3 و4 ناتج هضم العينتين الإيجابيتين 2 و5، على الترتيب، حيث يظهر كل منهما عصابة بحجم 190bp وعصابة أخرى بحجم 60bp. أظهرت النتائج إيجابية العينات المأخوذة جميعها في هذه الدراسة وبالغاة 300 عينة، أي استطاع هذا الاختبار تشخيص 100% من العينات. وأظهرت العينات جميعها امتلاكها للعصابة 320 زوج أساس قبل الهضم بإنزيم **Hae III**، وامتلاكها للعصابتين 60 و190 زوج أساس بعد الهضم بإنزيم **Hae III** وبالتالي فإن العينات جميعها تنتمي إلى نوع الليشمانية المدارية.

### ج- نوعية وحساسية الطرق المستخدمة في الدراسة

بالنسبة لحساسية الطرق السابقة لقد بلغت حساسية الفحص المباشر  $Sen=75.33\%$  حيث كانت  $TP=113$  و  $FN=37$ . وبلغت حساسية الزرع  $Sen=66.66\%$  حيث كانت  $TP=100$  و  $FN=50$ . أما بالنسبة لطريقة **ITS1-PCR** فلقد جرى تشخيص 300 عينة من أصل 300 عينة فبلغت حساسية الطريقة  $100\%$ . وبالتالي تعد طريقة **ITS1-PCR** الطريقة الأعلى حساسية وتليها في المرتبة الثانية طريقة الفحص المباشر، بينما احتل الزرع المرتبة الثالثة.

بما أن الفحص المباشر والزرع يعتمدان على رؤية الطفيلي تحت المجهر فإن نوعيتهما  $100\%$ . أما بالنسبة لنوعية اختبار **ITS1-PCR** فيتطلب تأكيد نوعيته اللجوء إلى تحديد تتالي النوكليوتيدات المشخصة في العينات التي كانت سلبية الزرع، وعدم اظهار أي إيجابية في العينات المأخوذة من قرحات تشبه قرحات الليشمانية والتي يمكن أن تتجم عن الإصابة بداء السل الجلدي، أو داء الجذام، أو داء الشعريات المبوغة، أو داء الفطار الكرواني، أو الأورام الخبيثة .

### 3-4 حساسية الذراري للأدوية

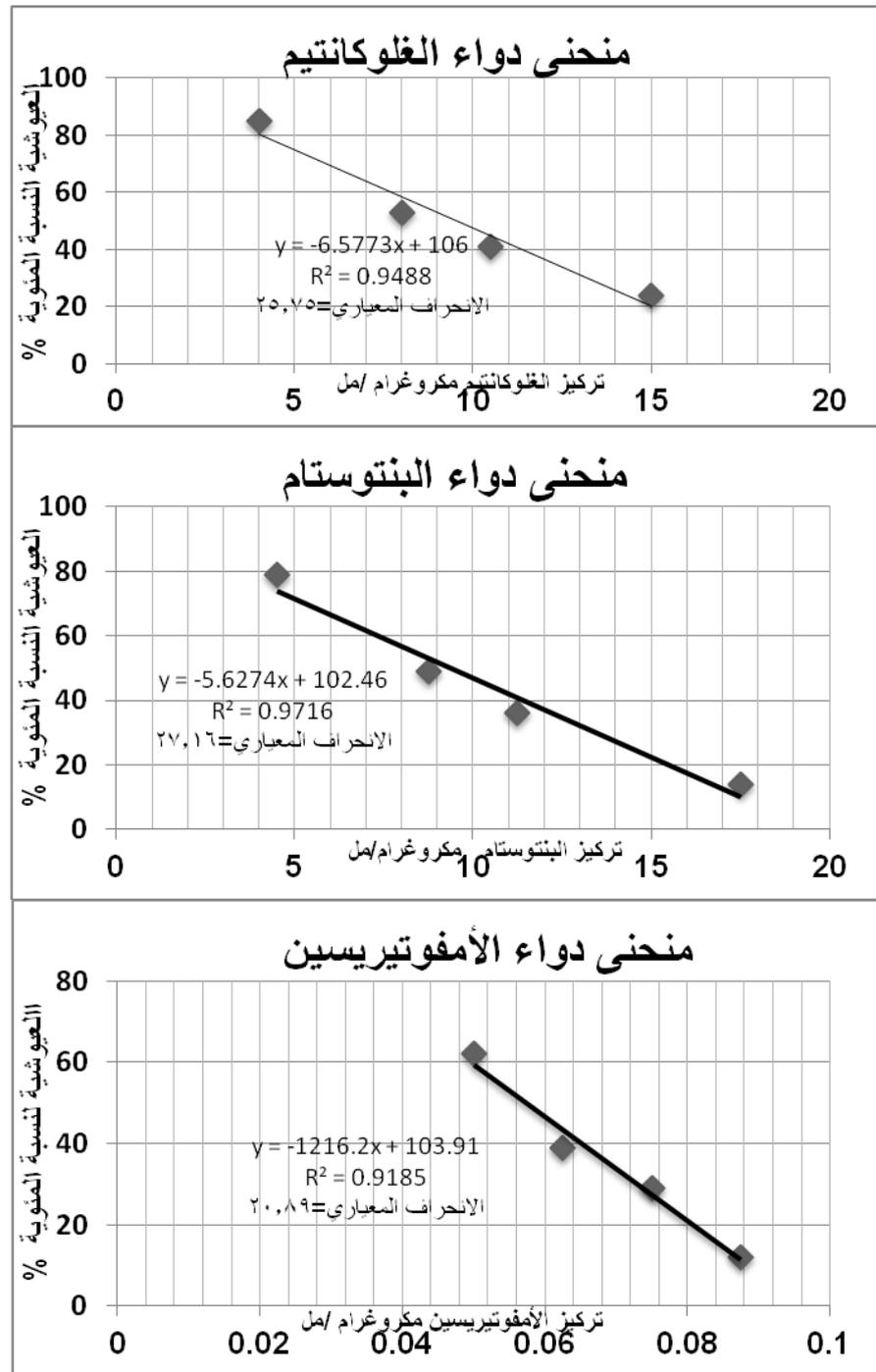
قمنا بدراسة تأثير الأدوية على تكاثر مشيقات طفيليات الليشمانية المدارية المزروعة في وسط **RPMI-1640** اعتماداً على حضن هذه الأشكال مع تراكيز مختلفة من الأدوية لمدة 24 ساعة وبالتالي تحديد التركيز **IC50**، لكل من البنتوسنام والغلوكانتيم والأمفوتيريسين ب، الذي يثبط 50% من الطفيليات. بين تطبيق الأدوية أن انخفاض العيوشية يتناسب طردياً مع ازدياد تركيز الدواء المطبق. ويمثل الشكل 10 العلاقة بين التراكيز المختلفة من الأدوية الثلاثة وعيوشية طفيليات ذرية من الذراري المدروسة، والمعادلة التي تختلف من ذرية لأخرى وتسمح بحساب تركيز **IC50** لكل دواء.

وبالتالي سمح تطبيق التراكيز المختلفة من كل دواء على كل ذرية من الذراري برسم المنحنيات الخاصة بكل ذرية لكل دواء من الأدوية الثلاثة، وتحديد المعادلة التي تجمع ما بين عيوشية

الطفيليات وتراكيز الدواء المطبقة بالنسبة لكل ذرية وبالتالي حساب **IC50** اعتماداً على هذه المعادلة.

جرى اختبار حساسية كل ذرية من الذراري التي استطعنا زرعها فقط والتي بلغت 200 ذرية. وبينت نتائجنا أن تراكيز **IC50** للغلوكانثيم تتراوح بالنسبة للعينات المختبرة بين 8.32-9.50 مكغ/مل وبلغ متوسط التركيز **IC50** 8.514 مكغ/مل وبلغ الانحراف المعياري 0.35. كما بينت نتائجنا أن تراكيز **IC50** للبنتوستام تتراوح بالنسبة للعينات المختبرة بين 9.30-10.55 مكغ/مل، وبلغ متوسط التركيز **IC50** 9.322 مكغ/مل وبلغ الانحراف المعياري 0.41 مكغ. وبينت نتائجنا أخيراً أن تراكيز **IC50** للأمفوتيرسين تتراوح بالنسبة للعينات المختبرة بين 0.040-0.051 مكغ/مل وبلغ متوسط التركيز **IC50** 0.0443 مكغ/مل وبلغ الانحراف المعياري 0.001 مكغ.

يظهر الشكل 10 أثر الأدوية على نمو الطفيليات في المختبر.



الشكل 10 : حساب التركيز المثبط لـ 50% من نمو الطفيليات المعزولة من احدى القرحات بعد

معالجتها بأربعة تراكيز مختلفة من كل من الغلوكانتييم أو البننتوستام أو الأمفوتيريسين وتحديد

المعادلة التي تربط بين العيوشية والتراكيز المختلفة للدواء والتي تسمح بدورها بحساب التركيز

المثبط لـ 50% من النمو لكل دواء.

### أ-العلاقة بين حساسية الذراري للأدوية وعدد الإصابات التي تسببها

بينت نتائجنا (الجدول 9) تقارب قيم تراكيز **IC50** للأدوية الثلاثة بالنسبة للذراري التي تسبب إصابة واحدة وقيم تراكيز الأدوية بالنسبة للذراري التي تسبب إصابتين أو ثلاث إصابات أو أربعة إصابات، أو خمسة إصابات.

الجدول 9: العلاقة بين متوسط تراكيز **IC50** لكل ذرية وعدد القرحات لدى المريض.

متوسط تراكيز IC50 للذراري المختلفة + الانحراف المعياري			نوع الذراري
الأمفونيريسين	البنتوستام	الغلوكانثيم	
0.001±0.0443	0.41±9.322	0.35±8.514	الذراري المعزولة من قرحة واحدة
0.002±0.0445	0.44±9.324	0.37±8.714	الذراري المعزولة من قرحتين
0.004±0.0441	0.42±9.39	0.35±8.411	الذراري المعزولة من ثلاثة قرحات
0.001±0.0447	0.42±9.315	0.33±8.540	الذراري المعزولة من أربعة قرحات
0.0015±0.044	0.411±9.320	0.35±8.35	الذراري المعزولة من 5-6 قرحات

وبالتالي لا توجد علاقة بين حساسية الذراري للأدوية وعدد الإصابات التي تسببها. ويوحى ذلك بأن الإصابات المتعددة نتجت عن ذراري متشابهة أو ذراري واحدة.

### ب\_العلاقة بين حساسية الذراري وقطر الإصابات التي تسببها

بينت نتائجنا (الجدول 10) تقارب قيم تراكيز **IC50** للأدوية الثلاثة بالنسبة للذراري التي تسبب قرحات ذات قطر صغير أو متوسط أو كبير.

وبالتالي وجدنا أن قطر القرحات ليس له أي علاقة بحساسية الليشمانية للدواء أي أنه سواء أكان قطر القرحة صغيراً أم كبيراً، فسيستجيب لنوع العلاج نفسه طالما أن النوع نفسه.

الجدول 10: العلاقة بين متوسط تراكيز IC50 لكل ذرية وقطر القرحة التي تسببها هذه الذرية.

متوسط تراكيز IC50 للذري المختلفة + الانحراف المعياري			قطر القرحة التي تسببها الذري المختلفة
الأمفوتريسين	البنستام	الغلوكانيم	
0.001±0.0443	0.44±9.324	0.33±8.540	1-0 سم
0.001±0.0447	0.41±9.322	0.35±8.35	2-1 سم
0.001±0.0447	0.41±9.322	0.33±8.540	3-2 سم
0.0015±0.044	0.44±9.324	0.35±8.514	5-4 سم
0.0015±0.044	0.411±9.320	0.35±8.411	6-5 سم

### ج- العلاقة بين حساسية الذري وعمر القرحة

الجدول 11: العلاقة بين متوسط تراكيز IC50 لكل ذرية وقطر القرحة التي تسببها هذه الذرية.

متوسط تراكيز IC50 للذري المختلفة + الانحراف المعياري			عمر الإصابات التي تسببها الذري المختلفة
الأمفوتريسين	البنستام	الغلوكانيم	
0.001±0.0443	0.42±9.315	0.35±8.514	أقل من عام
0.0015±0.044	0.41±9.322	0.35±8.35	1.5-1 عام
0.0015±0.044	0.41±9.322	0.35±8.514	2-1.5 عام
0.001±0.0443	0.411±9.320	0.35±8.35	أكثر من عامين

بينت نتائجنا (الجدول 11) تقارب قيم تراكيز IC50 للأدوية الثلاثة بين الذري التي تسببت بقرحات استمرت لمدة لا تتجاوز عاما واحدا، والذري التي تسببت بقرحات استمرت مدة تتراوح بين عام وعام ونصف، والذري التي تسببت بقرحات استمرت لمدة تتراوح بين عام وعام ونصف وعامين، والذري التي تسببت بقرحات استمرت لمدة تزيد عن عامين. وبالتالي لا توجد علاقة بين حساسية الذري والمدة التي تستمر خلالها القرحة عند المصابين بهذه الذري.

#### د- استجابة المرضى للعلاج في المراكز

جرت معالجة المصابين جميعهم بالغلوكانتييم في المركز التخصصي لليشمانيا وذلك بحقن الدواء ضمن القرحة الجلدية، حيث حقنت بـ 50 ملغ أسبوعياً لمدة شهر، مما تسبب بألم عند الحقن. وسمحت المعالجة بشفاء الحالات جميعها وذلك بغض النظر عن قطر القرحة أو عدد الإصابات أو عمر القرحة أو جنس المصاب. واستجابت الحالات جميعها والتي كانت سلبية بواسطة اختباري الفحص المباشر والزرع، وإيجابية بواسطة اختبار **ITS1-PCR**، مما يؤكد بشكل غير مباشر التشخيص السريري للإصابة بداء الليشمانيات الجلدي.

#### 5- المناقشة

تعد سورية من المناطق الموبوءة بالليشمانية الجلدية، إذ لاحظنا في السنوات الأخيرة تزايد عدد الإصابات الجلدية بشكل كبير في المحافظات السورية جميعها، مما جعل من داء الليشمانيات مشكلة صحية هامة تستدعي الدراسة. تهدف دراستنا إلى عزل وتحديد نوع وسلالات الطفيلي المسؤول عن الإصابات الجلدية في محافظة اللاذقية، وذلك من أجل وضع خطة لمكافحة هذا المرض والحد من انتشاره.

جرت الدراسة على عينات أخذت من مرضى سوريين راجعوا مركز الليشمانية في محافظة اللاذقية وكانوا من سكان محافظة اللاذقية. ولقد جرى انتقاؤهم وفقاً لمجموعة من الشروط التي سمحت بالتأكد من إصابتهم بداء الليشمانية في المناطق التي يعيشون فيها، حيث جرى التأكد من عدم مغادرتهم للمنطقة التي يقطنونها منذ ستة أشهر على الأقل. وجرى عزل الدنا من العينات التي أخذت من المرضى بعد زرعها وفحصها مجهرياً ومن ثم إجراء تمييز للعينات على مستوى النوع من خلال تضخيم المجال **ITS1** ومن ثم هضمه، حيث أظهرت نتائجنا أن العينات جميعها تنتمي إلى نوع الليشمانية المدارية. تشير كافة الدراسات التي جرت في مركز الدراسات الوبائية والبيولوجية لطفيليات الليشمانية إلى أن كافة الذراري المعزولة من مرضى مصابين بداء الليشمانيات، ينتمون إلى محافظات دمشق وحمص وحلب وحمص تنتمي إلى نوع الليشمانية المدارية (8،10). وتختلف نتائجنا عن ما يتناقله المختصون في وزارة الصحة حيث ذكروا في محاضرة في اليوم الطبي لكلية الطب أن الإصابات تعود إلى كل من الليشمانية

المدارية والليشمانيّة الكبرى الأخرى لكن لا توجد دراسات منشورة حديثة تؤكد ذلك علماً أن بعض الدراسات القديمة التي تعتمد على تنميط الطفيليات وفقاً لطريقة الزيموديم أشارت إلى عزل الليشمانيّة الكبرى من ريف دمشق (8) كما بينت دراسات أخرى انتشار الليشمانيّة الكبرى في بعض المحافظات الأخرى مثل دير الزور والحسكة والرقّة (10). إن الإصابات الجلدية في سوريا ناجمة عن النوعين السابقين، حيث تعود الإصابات في تركيا إلى الليشمانيّة الكبرى والليشمانيّة المدارية والليشمانيّة الطفلية (56). وتعود الإصابات في العراق إلى الليشمانيّة الكبرى والليشمانيّة المدارية (47). وتعود الإصابات في السعودية إلى الليشمانيّة الكبرى والليشمانيّة المدارية (54). وكذلك الأمر تعود الإصابات في لبنان إلى الليشمانيّة الكبرى والليشمانيّة المدارية (55). وتعود الإصابات في الأردن إلى الليشمانيّة الكبرى والليشمانيّة المدارية (57). وتعود الإصابات في فلسطين المحتلة إلى الليشمانيّة الكبرى والليشمانيّة المدارية (51).

تعد طرق الفحص المجهرى والزرع المعيار الذهبى في تشخيص الليشمانيّة الجلدية، خاصة في المناطق الفقيرة التي ينتشر فيها هذا الداء. وتعاني هذه الطرق من قلة حساسيتها واعتمادها بشكل أساسى على خبرة الفاحص وعلى عدد الطفيليات في العينة، ويحتاج الحصول على نتائج هذه الطرق فترات تتراوح بين عدة أيام إلى عدة أسابيع. ويعود انخفاض حساسية الطرق السابقة إلى الصعوبات الأخرى التي تواجه الزرع مثل تلوث الوسط الزرعى بالجراثيم والفطور وصعوبة الزرع الذي غالباً ما يكون غير متوفر في مختبرات المناطق الموبوءة، حيث يعتمد التشخيص على العلامات السريرية والفحص المباشر للعينات المأخوذة من المريض. وتعاني الطرق السابقة بشكل عام من انخفاض حساسيتها وبالتالي ظهرت الحاجة إلى طرق أخرى للتشخيص لا تتطلب خبرة كبيرة وتسمح باعطاء تشخيص سريع وهو ما استطاعت تقديمه الطرق المعتمدة على الكشف عن تتاليات محددة من الدنا. وبالتالي تظهر السلبيات السابقة الحاجة إلى استخدام طرق أخرى للتشخيص، حيث تشكل الطرق المعتمدة على كشف الدنا مجالاً واسعاً للعديد من الأبحاث. وبناء على خبرة مركز الدراسات الوبائية والبيولوجية لطفيليات الليشمانيّة في تطوير طريقة ITS1-PCR فقد استخدمنا هذه الطريقة في هذه الدراسة واستطاعت تشخيص كامل العينات وهو ما كان قد تم تأكيده مسبقاً" في دراسة سابقة لجمانة محمود (58).

يمكن أن تسمح الطرق الجزيئية بتشخيص الطفيليات من جهة وتتميطها من جهة أخرى، مما يسمح بتخطي الصعوبات التي يواجهها الفحص المباشر والزرع اللذين لا يسمحان بتحديد نوع الطفيلي المسؤول عن الإصابة. بالإضافة إلى ما سبق كانت حساسية طريقة **ITS1-PCR** 100%، الأفضل بين حساسية الطرق الأخرى التي استخدمت لتشخيص الليشمانية. وبالتالي تمتاز طريقة **ITS1-PCR** المتبعة بحساسيتها المرتفعة بالمقارنة مع الطرق الأخرى.

تمتاز دراستنا بارتفاع حساسية طريقة **ITS1-PCR** فبلغت 100% مقارنة مع الدراسات الأخرى التي ضخمت المنطقة نفسها من الدنا من الليشمانية المدارية واستخدمت المشاريع نفسها حيث بلغت 94% في دراسة **Schonian** وزملائها عام 2003 في (52)، وبلغت 91% في دراسة **Bensoussan** وزملائه عام 2006 في فلسطين المحتلة (51)، وبلغت 68% في دراسة حمزة وعلي في العراق عام 2012 (47)، وبلغت 90.5% في دراسة **Yazdan Panah** في إيران عام 2010 (46).

لقد سمحت التعديلات التي أجرتها جمانة محمود في 2011 (58) على البروتوكول الرئيسي الموضوع من قبل **Schonian** وزملائها عام 2003 بالحصول على حساسية أعلى من تلك المنشورة في الدراسات الأخرى ويوضح الجدولان 12-13 هذه التعديلات.

الجدول 12: الفروق بين برامج تضخيم المجال ITS1 في الدراسات المختلفة.

عدد الدورات	استطالة نهائية °C حرارة/زمن د	استطالة °C حرارة/زمن د	التحام °C حرارة/زمن ثا	مسح أولي °C حرارة/زمن د	الحساسية	برنامج التضخيم
35	6/72	1/72	30/53	2/95	%100	دراستنا
35	6/72	1/72	30/53	2/95	%94	<b>Schonian</b>
40	5/72	1/72	59/60	2/94	%91	<b>Bensoussan</b>
35	6/72	4/72	30/63	3/95	%68.5	حمزة وعلي
30	6/72	5/72	30/53	5/94	%90.5	<b>Panah</b>

يوضح الجدول 12 وجود فروق في برنامج تضخيم تفاعل PCR بين الدراسات المختلفة التي اعتمدت على تضخيم الميدان ITS1، كما يوضح الجدول 13 أيضاً وجود فروق في تركيز مكونات تفاعل PCR بين الدراسات المختلفة التي اعتمدت على تضخيم المجال ITS1. وبالتالي يمكن للفروق السابقة أن تفسر سبب ارتفاع حساسية البروتوكول الذي اتبعناه بالمقارنة مع البروتوكولات المتبعة من قبل الدراسات الأخرى.

قاربت نتائج حساسية الفحص المباشر والزرع التي حصلنا عليها مع نتائج دراسة Bensoussan وزملائه عام 2006 (51)، إذ وجد أن حساسية الفحص المباشر 74.4% والزرع 62.8% وذلك على عينات لآفات ناجمة عن الليشمانيا المدارية والليشمانيا الكبرى في فلسطين المحتلة، بينما كانت تفوق الحساسية المسجلة في دراسة حمزة وعلي في العراق عام 2012، حيث بلغت حساسية الفحص المباشر 59% وحساسية الزرع 29% (47)، كما كانت أفضل من نتائج دراسة Yazdan Panah في إيران عام 2010 حيث بلغت حساسية الفحص المباشر 90.5% وحساسية الزرع 39% (46). وأخيراً كانت نتائج الدراسة التي توصلنا لها قريبة من نتائج جمانة محمود وزملائها في محافظة دمشق (58) حيث بلغت حساسية الفحص المباشر 72.85%، والزرع 68.57%، وطريقة ITS1-PCR 100%.

الجدول 13: تبدلات التراكيز النهائية لمكونات تفاعل PCR.

الدراسة	الحجم النهائي مكل	إنزيم Taq	MgCl2 كلوريد المغنيزيوم مكل	المشرع مكل	dNTPs مكل	الوقاء×10 مكل
دراستنا	50	2	1.5	5	5	5
Schonian	50	1	2	0.5	0.2	5
Bensoussan	30	1	2	0.75	0.2	5
حمزة وعلي	25	1	1.5	10	5	5
Panah	25	1	1.5	40	1.5	2.5

بينت نتائجنا ارتفاع نسبة الأطفال المصابين بالمقارنة مع باقي الشرائح العمرية ويمكن أن يعود ذلك لرغبة الأطفال الكبيرة باللعب وبالتالي خروجهم خارج المنزل لفترات طويلة مما يزيد امكانية تعرضهم للسعات الحشرة الناقلة. كما بينت نتائجنا ارتفاع نسبة الإناث المصابات مقارنة مع نسبة الذكور. وتتعارض هذه النتيجة مع نتيجة معروف الذي وجد أن الذكور هم الأكثر إصابة في دمشق وريف دمشق، يمكن أن يعود ذلك إلى كون المناطق المدروسة من المناطق الريفية التي تتحمل فيها المرأة المسؤولية الأكبر في ما يتعلق بالأعمال الزراعية، مما يجعل امكانية تعرضها للحشرة أكبر من امكانية تعرض الذكور. لقد حاولت العديد من الدراسات ربط ارتفاع النسبة لدى الذكور مع الهرمونات الجنسية حيث بينت الدراسات امكانية الربط بين ارتفاع نسب الإصابة لدى الذكور ومستويات الهرمونات الجنسية (49).

بينت نتائجنا أن ذراري الليشمانية التي تتواجد في محافظة اللاذقية حساسة لكل من الغلوكانثيم والبننتوستام، حيث بلغ متوسط تراكيز **IC50** للغلوكانثيم 8.514 مكغ/مل وللبنتوستام 9.322 مكغ/مل و 0.0443 مكغ/مل. وبالتالي نلاحظ أن النتائج قريبة جداً من نتائج الدراسات السابقة، حيث بينت الدراسات أن متوسط التركيز **IC50** لذراري الليشمانية المدارية المعزولة من لبنان يساوي 8.955 مكغ/مل (55)، ولتلك المعزولة من الأردن يساوي 9.125 مكغ/مل (57)، ولتلك المعزولة من فلسطين المحتلة 8.652 مكغ/مل (51)، ولتلك المعزولة من العراق يساوي 9.225 مكغ/مل (47)، ولتلك المعزولة من تركيا 8.447 مكغ/مل (50).

يشير عدم وجود فروق جوهرية بين حساسية الذراري المعزولة من الإصابات التي استمرت لمدة نقل عن عام أو لمدة تتراوح بين عام إلى عامين، إلى أن عدم الشفاء لا يعود إلى فروق في حساسية الذراري للدواء المستخدم وإنما يعود إلى عوامل أخرى ويمكن أن تشكل الفروق بين رد الفعل المناعي عند المصابين أهمها.

كذلك الأمر وجدنا أن قطر الإصابات ليس له أي علاقة بحساسية الليشمانية للدواء أي أنه سواء أكان قطر الإصابة صغيراً أم كبيراً. وفي الحقيقة تعود الفروق بين قطر الإصابات بشكل رئيسي إلى فروق بين القدرة الممرضة للذراري المعزولة، لكن هذه الفروق لم تتوافق مع فروق في حساسية هذه الذراري للأدوية.

## 6- الاستنتاجات

- انتشار داء الليشمانيات الجلدي بشكل واسع في محافظة اللاذقية
- ينجم داء الليشمانيات الجلدي في المناطق المدروسة عن الليشمانية المدارية فقط.
- الذراري المعزولة حساسة للأدوية جميعها وبالتالي لا توجد ذراري مقاومة للأدوية.
- حساسية طريقة ITS1-PCR هي الأفضل بين طرق تشخيص الإصابات بالليشمانية.

## 7- التوصيات

- يجب أن تعتمد مكافحة الإصابة بالليشمانية في اللاذقية على كشف الإصابات عند الإنسان ومعالجتها والقضاء على العامل المسبب.
- استخدام طريقة ITS1-PCR للرصد الوبائي المستمر للذراري وانتشارها في سورية.
- متابعة ترميط الذراري المعزولة من الإصابات من باقي محافظات القطر للتأكد من نوع الليشمانية الموجودة في كل أنحاء القطر.

**8-المراجع**

- 1- World Health Organization expert committee, The Leishmaniasis, WHO technical report series 701, WHO press, 1984.**
- 2- World Health Organization expert committee, Control of the leishmaniasis, WHO technical report series 949, WHO press, 2010.**
- 3- Ul Bari A, and Ber Rahman S, Cutaneous leishmaniasis: an overview of parasitology and host-parasite-vector inter relationship, JPAD. 2008; 18: 42-8.**
- 4-Kellina OI, On the dimensions of the leishmanial forms of *Leishmania tropica major* and *Leishmania tropica minor*, Med Parazitol (Mosk).1962; 3(1): 716-8.**
- 5- Sharma U, and Singh S, Insect vectors of leishmania: distribution, physiology and their control, J Vector Borne Dis. 2008; 45: 255– 72.**
- 6-Morsy TA, Abou el-Ela RG, Rifaat MM, and al-Dakhil MA, The seasonal and daily activities of *phlebotomus papatasi* in Riyadh, Saudi Arabia, J Egypt Soc Parasitol. 1995; 25(3): 699-711.**
- 7-Killiick-Kendrick R, Phlebotomine vectors of the leishmaniasis, a review, Med Vet Entomol.1990; (4): 1-24.**
- 8-Klaus SN, Frankenburg S, and Ingber A, Epidemiology of cutaneous leishmaniasis, Clin Dermatol.1999; 17(3):257-260.**
- 9-Hepburn NC, Cutaneous leishmaniasis, Clin Exp Dermatol. 2000; 25(5): 363- 70.**
- 10-Postigo JA, Leishmaniasis in the World Health Organization Eastern Mediterranean region, Int J Antimicrob Agents. 2010; 36S: S62–5.**
- 11-Marouf M, Distribution of cutaneous leishmaniasis in Damascus and its suburbs during 2002-2005, Arab Journal of Pharmaceutical Sciences. 2006; 3(3): 39-51.**

- 12-Shaabani M, Contribution of leishmania typing and immunodiagnosis of leishmaniasis in Syria using different immuno methods, PHD, Damascus University. 2008.
- 13-Gelpi AP, Alexander Russell and the Aleppo ulcer, *Int J Dermatol.* 1987; 26 (2): 131- 4.
- 14-Tayeh A, Jalook L, and Caincross S, Twenty years of cutaneous leishmaniasis in Aleppo, Syria, *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 1997; 91(6): 657- 9.
- 15-Kedzierski L, Zhu Y, and Handman E, Leishmania vaccines: Progress and problem, *Parasitology.* 2006; 133: 87– 112.
- 16-Harris E, Kropp G, Belli A, Rodriguez B, and Agabian N, Single-step multiplex PCR assay for characterization of new world leishmania complexes, *J Clin Microbiol.* 1998; 36(7): 1989-95.
- 17-Chulay DJ, Leishmaniasis in "Hunters tropical medicine 7<sup>th</sup> ed"; Ed. Strickland GT, and Hunters G; Pub. Saunders 1991: 638-55.
- 18- Kaneria MV, Jagtap S, Modi C, and Kamath S, A typical presentation of visceral leishmaniasis, *JAPI.* 2005; 53: 573-5.
- 19- Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, and Brooker S, Cutaneous leishmaniasis, *Lancet Infect Dis.* 2007; 7(9): 581–96.
- 20-Tojal da Silva AC, Cupolillo E, Volpini AC, Almeida R, and Romero GA, Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil, *Trop Med Int Health.* 2006; 11(9): 1388– 98.
- 21-Rodriguez N, Guzman B, Rodas A, Takiff H, Bloom BR, and Convit J, Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization, *J Clin Microbiol.* 1994; 32(9): 2246-52.
- 22-Kalter DC, Laboratory tests for the diagnosis and evaluation of leishmaniasis, *Dermatol Clin.* 1994; 12(1): 37-50.

- 23-Singh S, New developments in diagnosis of leishmaniasis, *Indian J Med Res.* 2006; 123(3): 311-30.
- 24-Navin TR, Arana FE, de Mérida AM, Arana BA, Castillo AL, and Silvers DN, cutaneous leishmaniasis in Guatemala: comparison of diagnostic methods, *Am J Trop Med Hyg.* 1990; 42(1): 36-42.
- 25-University of Glasgow, Protocols for handling and working with leishmania species, Mottram laboratory 2008.
- 26-World Health Organization, leishmaniasis :culture of leishmania from aspirate or biopsy samples, WHO press, 1994.
- 27-Schuster FL, and Sullivan JJ, Cultivation of clinically significant hemoflagellates, *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(3): 374–89.
- 28-Schallig HD, and Oskam L, Molecular biological application in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification, *Trop Med Int Health.* 2002; 7(8): 641-51
- 29-Gradoni L, and Gramiccia M, Leishmaniosis in "Oie terrestrial manual" ; Office of International Education 2008.
- 30-Kalter DC, Laboratory tests for the diagnosis and evaluation of leishmaniasis, *Dermatol Clin.* 1994; 12(1): 37-50.
- 31-Reithinger R, and Dujardin J, Molecular diagnosis of leishmaniasis: Current status and future applications, *J Clin Microbiol.* 2007; 45(1): 21– 5
- 32-Tashakori M, Ajdary S, Kariminia A, Mahboudi F, and Alimohammadian MH, 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
- 33-Pratlong F, Dedet JP, Marty P, Portús M, Deniau M, Dereure J, Abranches P, Reynes J, Martini A, and Lefebvre M, Leishmania – HIV coinfection in the Mediterranean basin: isoenzymatic characterization of 100 isolates of the Leishmania infantum Complex, *J infect Dis.* 1995; 172(1): 323-6.

- 34-Gomes AH, Ferreira IM, Lima ML, Cunha EA, Garcia AS, Araújo MF, and Pereira-Chiocola VL, PCR identification of Leishmania in diagnosis and control of canine leishmaniasis, *Vet Parasitol.* 2007; 144(3-4): 234–41
- 35-Van Eys GJ, Schoone GJ, Ligthart GS, Alvar J, Evans DA, and Terpstra WJ, Identification of Old World Leishmania by DNA recombinant probes, *Mol Biochem Parasitol.* 1989; 34(1): 53–62.
- 36-Van Eys GJ., Guizani I, Ligthart GS, and Dellagi K, A nuclear DNA probe for the identification of strains within the Leishmania donovani complex, *Exp Parasitol.* 1991; 72(4): 459–63.
- 37-Alimoradi S, Hajjaran H, Mohebbi M, and Mansouri F, Molecular identification of leishmania species isolated from human cutaneous leishmaniasis by RAPD-PCR, *Iranian J Publ Health.* 2009; 38(2): 44-50.
- 38-Cooper G, Amos W, Bellamy R, Siddiqui MR, Frodsham A, Hill AV, and Rubinsztein DC, An empirical exploration of the ( $\Delta\mu$ )<sup>2</sup> genetic distance for 213 human microsatellite markers, *Am J Hum Genet.* 1999; 65(4):1125-33.
- 39-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 comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites, *Nature.* 1996; 380(6570): 152–4.
- 40-Knapik EW, Goodman A, Ekker M, Chevrette M, Delgado J, Neuhauss S, Shimoda N, Driever W, Fishman MC, and Jacob HJ, A microsatellite genetic linkage map for zebrafish (*Danio rerio*), *Nat Genet.* 1998; 18(4): 338-43.
- 41-Kumar R, Bumb R, Nasim A, and Rajesh D, Cutaneous leishmaniasis caused by leishmania tropica in BIKANER, INDIA: Parasite identification and characterization using molecular and immunologic tools, *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 76(5): 896–901

42- Salotra P, Sreenivas G, Pogue GP, Lee N, Nakhasi HL, Ramesh V, and Negi NS, 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.* 2001; 39(3): 849-54.

43-Pelt-Verkuil EV, Belkum AV, and Hays JP, Analysis of PCR amplification products in "Principles and Technical Aspects of PCR Amplification"; Ed. Pelt-Verkuil EV, Belkum AV, and Hays JP; Pub. Springer 2008: 141-82.

44-Croft SL and Coombs GH. Leishmaniasis- current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol* 2003; 19 : 502-8.

45-Singh S, Dey A and Sivakumar R. Applications of molecular methods for Leishmania control. *Expert Rev Mol Diagn.* 2005; 5 : 251-65.

46- Yazdan Panah MD. The PCR-based detection of Leishmania major infections in Meriones libycus (Rodentia: Muridae) from southern Iran. *Ann Trop Med Parasitol* 2010;97(8):811-816.

47- Hamseh E and Ali H, Cutaneous leishmaniasis in Iraq. *J Infect Developing Countries*, 2012 ; 3(2):123-129.

48-World Health Organization, leishmaniasis :culture of leishmania from aspirate or biopsy samples, WHO press, 1994.

49-Schuster FL, and Sullivan JJ, Cultivation of clinically significant hemoflagellates, *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(3): 374–89

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

51- Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, and Jaffe CL, Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis, *J Clin Microbiol.* 2006; 44(4): 1435–9

52- Schonian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W and Jaffe CL, PCR diagnosis and characterization of

leishmania in local and imported clinical samples, *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003; 47(1): 349– 58.

53-Griffiths WAD. Old World cutaneous leishmaniasis. In:Peters W, Killick-Kendrick, R, editors. *The leishmaniasis inBiology and Medicine.Vol.II.London:AcademicPress;1987.p.617-663.*

54- Peters Wand Al-Zahrani MA. The leishmaniasis – a common health problem in Saudi Arabia. *Saudi Med J* 1987; 8:333-343.

55-. Nuwayri-Salti N, Baydoun E, El-Tawk R, Fakhoury R and Knio K. The epidemiology of leishmaniasis in Lebanon. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 2000; 94:164-166.

56- Demirel R. Determination of High Risk Regions of Cutaneous Leishmaniasis in Turkey Using Spatial Analysis, *Türkiye Parazitoloji Dergisi.*2009; 33 (1): 8 - 14.

57-Nimri L, Soubani R and Gramiccia M. *Leishmania* species and zymodemes isolated from endemic areas of cutaneous leishmaniasis in Jordan. *Kinetoplastid Biol Dis* .2002;1(1):7.

58- محمود جمانة. دراسة مقارنة للتقانات المختلفة المستخدمة لتشخيص الليشمانية. رسالة

ماجستير، كلية الصيدلة، جامعة دمشق، 2011.

## المخلص:

ينتشر داء الليشمانيات في ثمانٍ وثمانين دولة من دول العالم ومنها الجمهورية العربية السورية، ويسبب هذا الداء طفيلي وحيد خلية من أنواع جنس الليشمانيات، وينتمي لهذا الجنس نحو اثنين وعشرين نوعاً ممرضاً للإنسان. يعرف للداء ثلاثة أشكال سريرية هي الداء الجلدي والداء الجلدي المخاطي والداء الحشوي. وقد طورت مجموعة من طرائق التشخيص وتحديد نوع الطفيلي بهدف إعطاء العلاج المناسب، يتضمن التحليل الايزوانزيمي والطرائق المصلية المناعية وتقانات تهجين الـ **DNA**. ولعل من أهم الطرق الجزيئية المعتمدة حالياً في تشخيص هذا الداء ومعرفة نوع الطفيلي المسبب وأدقها هي تقنية التفاعل السلسلي للبوليميراز الـ **PCR**. قمنا في هذا العمل بدراسة الحساسية والنوعية للفحص المجهرى وللزرع وللا **ITS1-PCR** وتم تحديد نوع طفيلي الليشمانيات المسؤول عن الإصابات الجلدية وتبين أنها من نوع الليشمانيات المدارية كما تم دراسة حساسية الطفيليات لدواء الغلوكانتيم والبنستام والأمفوتيريسين فوجدنا أن هذه الطفيليات حساسة لجميع الأدوية ولم يتم عزل ذراري مقاومة.

الكلمات المفتاحية: داء الليشمانيات الجلدية، الليشمانيات المدارية، التفاعل السلسلي للبوليميراز الـ **PCR**.

**ABSTRACT**

**Leishmaniasis spreads in eighty-eight countries, including the Syrian Arab Republic. This disease is caused by a protozoic parasite of the genus Leishmania. Twenty-two species of leishmania were reported to be pathogenic for human. The disease is presented in three clinical forms: cutaneous, mucocutaneous and visceral leishmaniasis. A set of methods for diagnosis and identifying the type of parasite have been developed in order to give appropriate treatment. These methods include isoenzyme analysis, serological and immunological methods and DNA hybridization. The polymerase chain reaction (PCR); provides an excellent tool for diagnosis and characterization of leishmania species. we have in this work to study the sensitivity and specificity of microscopic examination ,transplantation and ITS1-PCR which identified the type of parasite Leishmania responsible for skin lesions. the kind of Leishmania was tropica. we also studied the sensitivity of the parasite to the drug glucantim ,pintoustam and amphotericin, We found that these parasites are sensitive to all drugs, we have not been isolated strains resistance.**

**Keywords: leishmaniasis skin, Leishmania tropica, polymerase chain reaction of PCR.**

**Damascus University**

**Faculty of Civil Engineering**

**Structure Engineering Department**



**Typing of Leishmania species responsible of cutaneous lesions in Lattakia**

A thesis prepared to get a master degree in Civil Engineering-  
Department of Structural Engineering

**Prepared by student:**

Eng. Manal Ali

**Supervised by Dr Eng:**

Mohammad Maarouf

**Damascus 2014**