Molecular and Immunological study of Cutaneous Leishmania in Karbala city

دراسة جزيئية ومناعية لطفيلي اللشمانيا الجلدية *Cutaneous Leishmania* في محافظة كربلاء

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

الخلاصة

أجريت الدراسة في محافظة كربلاء وللفترة من (2010-2011) بواقع 73 اصابة الى عام (2011-2012) 52 اصابة بنسبة 58.4 % و 41.6 % على التوالي ، توزعت على المناطق السكنية في المحافظة : قضاء عين التمر كانت 51 (40.8%) وهي الاكثر نسبة تليها ناحية الحسينية 29 (23.2%) ثم ناحية الحر 17(13.6%) والاحياء الجنوبية 16(12.8%) ثم الاحياء الشمالية 7 (5.6%) واخيرا مركز المحافظة 5 (4%) .

والتشخيص الجزيئي بتفاعل البلمرة المتسلسل لعينات المحافظة اظهر وجود اللشمانيا المدارية *L. tropica* وكانت بنسبة 31 (24.8%) وبواقع 22 (17.6%) للذكور و9 (7.2%) للاناث ، واللشمانيا الكبرى *L. major* كانت الاصابة 94 (75.2%) والنسبة بين الجنسين 55 (44%) و39 (31.2%) للذكور والاناث على التوالي .

ودلت الدراسة المناعية لامصال المرضى باللشمانيا الكبرى*L. major* وبتقنية الاليزا ELISA ارتفاع معدلات قيم الكلوبيولينات المناعية IgG و IgM أثناء الخمج بشكل ملحوظ مقارنة بمجموعة السيطرة ، ثم انخفضت تدريجيا بعد العلاج وكانت نسبة الجسم المضاد IgG (1811.1 ± 523.1 ملغم / د.لتر) والجسم المضاد IgM (166.7 ± 23.6 ملغم / د.لتر) وكذلك في المصابين باللشمانيا المدارية *L. tropica* كانت قيمة IgG (1722.1 ± 524.0ملغم/ د.لتر) والجسم المضاد IgM (25.3 ± 182.9 ملغم / د.لتر) مقارنة بعينات السيطرة ، ثم انخفضت النسب بعد جرعات العلاج بعقار البنتوستام Pentostam .

أظهرت قيم المحركات الخلوية زيادة معنوية حيث بلغ الانترفيرون كاما (IFN-γ) للمرضى المصابين باللشمانيا الجلدية الكبرى (113.2±5.5 ملغم/د.لتر) أما بعد العلاج فكان هناك انخفاضاً معنوياً (6.05±3.0 ملغم /د.لتر) ، وكذلك الحال في اللشمانيا المدارية حيث كانت النسبة (88.2±6.5 ملغم /د.لتر) ولم تشكل فرق معنوي بعد المعاملة مع السيطرة . وظهرت زيادة في معدلات المحرك الخلوي IL-10 حيث بلغت في الكبرى (215.0±9.8 ملغم /د.لتر) وبعد المعاملة كانت (9.02±5.1 ملغم /د.لتر) ، وفي عينات المدارية كانت النسبة (115.0±8.8 ملغم/د.لتر) ولم يظهر فرق معنوي بعد المعاملة مع عينات السيطرة .

Summary

This study was conduct to investigation the infections of Cutaneous Leishmania in karbala city , (73) of infections were in (2010-2011) and (125) were in (2011-2012) with ratio 58.4 % and % 41.6 respectively . The infections were distributed according to the inhibited areas of karbala governorate of following .

51 (%40.8) in EinAl-Tamir , 29 (%23.2) in Al-Husseinya , 17 (13.6%) in Al-Hur , 16 (%12.8) in the south quarters, 7 (5.6%) in the north quarters and 5 (4%) in the city center .

The immunological study for the patients serums with *L. major* by ELISA technique has shown significantly raised in values of IgG and IgM during infection in comparison with the control group , then it declined slowly after treatment in which IgG was in mean (1811.1 ± 523.1 mg/dl) , and IgM mean was (166.7 ±23.6 mg/dl). Also, in *L. tropica* – IgG mean was (1722.1 ± 524.0mg/dl) and IgM was in ratio (25.3±182.9mg/dl) in comparison with control specimens , and then the mean have declined after treatment dosages with Pentostam drug.

The cellular dynamics values have shown an significantly increase in which interferon-gamma (IFN-γ) in infected patients with cutaneous *L. major* were (113.2±5.5mg/dl) which

declined after treatment abstractly to (6.05±3.0mg/dl) as well as for *L. tropica* (88.2±6.5mg/dl)

which shows no significant abstract difference after treatment with control .

An increase appears in cytokine IL-10 that reached in *L.major* (215.0±9.8mg/dl) and after treatment was (9.02±5.1mg/dl) and in *L. tropica* was (115.0±8.8mg/dl) with no significant difference after treatment with control specimen .

المقدمة

تظهر سنويا حوالي 12 مليون حالة من حالات الاصابة بداء اللشمانيات تظهر سنويا ، منها 1.5-2 مليون حالة جديدة من داء اللشمانيات الجلدي و 500,000 حالة من داء الليشمانيات الاحشائي ، كما ان عدوى الاصابة بفيروس نقص المناعة البشرية HIV/AIDS يزيد من خطر الاصابة في النوع الحشوي (1) . وقد سجلت كل من الليشمانيا الجلدية والاحشائية Cutaneous Leishmania CL و VLVeseral Leishmania (حبة بغداد والحمى السوداء) في العراق بنوعيها والناجمة عن *L.donovani*، *L.major* و *L.tropica* (2) و (3) اذ لوحظ ارتفاع معدل الاصابة باللشمانيا الجلدية لعام 2010 وبلغ (0.96) عما كانت عليه في عام 2009 حيث سجلت (0.65) لكل 1000 من السكان وكانت محافظة ميســـان قد سجلت اعلى المعـــدلات وبلغـت (6.14) وادنى المحافظات كانت محافظة بـغداد / الرصافة حيث كان معـدل الاصــابة فيـها (0.05) لكل1000 نسمة من السكان علما ان المحافظات الشمالية سجلت (13) حالة منها (12) حالة في محافظة السليمانية .

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

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

ان شكل اللشمانيا الجلدية يتدرج من شكل بسيط إلى معقد وان تحديد المواصفات له مهم جدا في تحديد استراتيجيات السيطرة والوقاية والعلاج. و تشابه اعراض مرض اللشمانيا الجلدي تلك التي تظهر في العديد من الأمراض الجلدية الأخرى ، ومن ثم فإن تأكيد نوع الطفيلي يكون ضروري عند الاشتباه في التشخيص. (9) و(10) .

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

هدفت هذه الدراسة الى تحقيق المحاور التالية :

1- دراسة شاملة من تحديد وتوصيف الأنواع التي تسبب الداء الجلدي CL في محافظات الفرات الاوسط والجنوب والتي لديها أهمية هائلة في الوبائية . ويتم التعرف عليها من خلال الطرق الروتينية فضلا عن التشخيص الجزيئي بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل(PCR) بتحديد الجين المستخدم في تشخيص الطفيلي .

2- دراسة لبعض الاوجه المناعية للمرضى المصابين في محافظة كربلاء .

المواد وطرائق العمل

جرت دراسة 125 شخصا مصابا بداء اللشمانيّا الجلدية *Cutaneous Leishmaniasis* بعد تشخيصها من قبل أطباء الاختصاص في الامراض الجلدية في مستشفيات محافظة كربلاء واستخدمت للتنمة الأوساط التالية :

- الوسط ثنائي الطور Biphasic Medium (15)
- الوسط الزرعي الهلامي Semi-Solid Medium (16)
- الوسط الزرعي (RPM I -1640 (Roswell park medium institute

وأجريت دراسة جزيئية من خلال :

- استخلاص الـ DNA

- ترحيل الـــ DNA Agarose Gel Electrophoresis (17)
- تفاعل أنزيم البلمره المتسلسل(Polymerase Chain Reaction (PCR
- تحميل إلـ DNA والترحيل الكهربائي DNA loading & Electrophoresis

* الدراسة المناعية للمرضى المصابين في محافظة كربلاء المقدسة
(جرعة عقار البنتوستام كانت 20 مايكروغرام لكل كغم)

تم تحليل البيانات التجريبية ، بواسطة (10.01 SPSS) لمعرفة الفروق المعنوية باستخدام ما يلي :

1- اختبار مربع كاي Chi-square test : واعتبرت $P\ value \leq 0.05$ ذات دلالة احصائية .
2- اختبار مربع كاي Chi-square test : واعتبرت $P\ value \leq 0.01$ ذات دلالة احصائية .
3- تحليل التباين باستخدام اختبار (ANOVA) : واعتبرت $P\ value \leq 0.05$ ذات دلالة إحصائية

النتائج Results

1-اللشمانيا الجلدية في محافظة كربلاء المقدسة Cutaneous leishmaniasis in Karbala province

جدول (1) توزيع المرضى المصابين بداء اللشمانيّا الجلدية حسب مناطق السكن في محافظة كربلاء للعامين (2010-2011) و (2011-2012)

مناطق السكن	الذكور	الاناث	العدد الكلي	النسبة المئوية
قضاء عين التمر	36	15	51	%40.8
ناحية الحسينية	16	13	29	%23.2
ناحية الحر	10	7	17	%13.6
الاحياء الجنوبية	9	7	16	%12.8
الاحياء الشمالية	5	2	7	%5.6
مركز المحافظة	1	4	5	%4
المجموع	77	48	125	%100
χ 2	** 10.26 الفرق المعنوي بين مناطق السكن			

**=P< 0.01

جدول (2) توزيع المرضى المصابين بداء اللشمانيّا الجلدية حسب مناطق السكن في محافظة كربلاء لعام (2010-2011)

مناطق السكن	الذكور	الاناث	العدد الكلي	النسبة المئوية
قضاء عين التمر	19	10	29	%39.7
ناحية الحسينية	12	9	21	%28.7
ناحية الحر	5	4	9	%12.3
الاحياء الجنوبية	5	3	8	%10.9
الاحياء الشمالية	3	1	4	%5.4
مركز المحافظة	1	1	2	%2.7
المجموع	45	28	(%58.4)73	%100
χ 2	** 11.31 الفرق المعنوي بين مناطق السكن			

**= P< 0.01

جدول (3) توزيع اللشمانيا الجلدية في محافظة كربلاء استنادا الى اشهر السنة للعام (2010-2011)

الشهر	الذكور	الاناث	العدد الكلي	النسبة المئوية
تشرين الاول 2010	8	4	12	%16.4
تشرين الثاني 2010	9	5	14	%19.1
كانون الاول 2010	8	5	13	%17.8
كانون الثاني 2011	7	3	10	%13.6
شباط 2011	7	2	9	%12.3
اذار 2011	5	3	8	%10.9
نيسان 2011	1	2	3	%4.1
مايس 2011	1	1	2	%2.7
حزيران 2011	0	1	1	%1.3
تموز 2011	0	0	0	0
اب 2011	1	0	1	%1.3
ايلول 2011	0	0	0	0
المجموع	47 (%64.4)	26 (%35.6)	73	%100

جدول (4) توزيع المرضى المصابين بداء اللشمانيّا الجلدية حسب مناطق السكن في محافظة كربلاء لعام (2011-2012)

مناطق السكن	الذكور	الاناث	العدد الكلي	النسبة المئوية
قضاء عين التمر	12	10	22	%42.3
ناحية الحسينية	7	2	8	%15.3
ناحية الحر	3	5	8	%15.3
الاحياء الجنوبية	2	6	8	%15.3
الاحياء الشمالية	3	0	3	%5.7
مركز المحافظة	2	1	3	%5.7
المجموع	28	24	(%41.6)52	%100
χ 2	** 9.04 الفرق المعنوي بين مناطق السكن			

**= P< 0.01

جدول (5) توزيع اللشمانيا الجلدية في محافظة كربلاء استنادا الى اشهر السنة للعام (2011-2012)

الشهر	الذكور	الاناث	العدد الكلي	النسبة المئوية
تشرين الاول 2011	5	3	8	%15.3
تشرين الثاني 2011	3	4	7	%13.4
كانون الاول 2011	7	4	11	%21
كانون الثاني 2012	5	4	9	%17.3
شباط 2012	5	3	8	%15.3
اذار 2012	2	0	2	%3.8
نيسان 2012	0	3	3	%5.7
مايس 2012	0	1	1	%1.9
حزيران 2012	1	0	1	%1.9
تموز 2012	0	2	2	%3.8
اب 2012	0	0	0	%0
ايلول 2012	0	0	0	%0
المجموع	28(%53.8)	24(%46.1)	52	%100

1- انواع الطفيليات المسببة للشمانيا الجلدية في محافظة كربلاء وفقا لتشخيص تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR

جدول (6) توزيع اللشمانيا الجلدية في محافظة كربلاء استنادا الى نوع الطفيلي المسبب والجنس

المنطقة السكنية	عدد الحالات	PCR			
		L-tropica		*L-major*	
		الذكور	الاناث	الذكور	الاناث
قضاء عين التمر	51	12	4	24	11
ناحية الحسينية	29	3	2	13	11
ناحية الحر	17	4	1	6	6
الاحياء الجنوبية	16	2	2	7	5
الاحياء الشمالية	7	1	0	4	2
مركز المحافظة	5	0	0	1	4
المجموع	125	22 (%17.6)	9 (%7.2)	55 (%44)	39 (%31.2)
%	%100	31 (%24.8)		94 (%75.2)	
$\chi 2$		9.55 **			

**= P< 0.01

3-الدراسة المناعية للمرضى المصابين بداء اللشمانيا الجلدية في محافظة كربلاء

تم سحب عينات دم من المصابين في محافظة كربلاء – مستشفى الحسين العام بواقع 5 مل لكل مصاب وفصلت بالطرد المركزي للحصول على الامصال وحفظت في درجة حرارة (-20) لغرض اجراء الاختبارات المناعية لدى المريض وكالاتي :

- مستويات الغلوبيولينات المناعية الكلية IgG وIgM لدى المصابين بطفيلي اللشمانيا الجلدية الكبرى (*L. major*) بتقنية الاليزا (ELISA)

جدول (7) يوضح معدل التراكيز SE ± (ملغم / د.لتر) للاميونوكلوبيولين IgG و IgM في امصال (94) مريض مصاب باللشمانيا الجلدية الكبرى (*L. major*) والاشخاص الاصحاء

الكلوبيولين المناعي	مجموعة السيطرة	المصابين	P- value
IgG	775.0 ± 162.4	1811.1 ± 523.1	< 0.05
IgM	119.0 ± 21.5	166.7 ± 23.6	< 0.05

جدول (8) يوضح معدل التراكيز Mean ± SE(ملغم / د.لتر) للاميونوكلوبيولين IgG و IgM في امصال (94) مريض مصاب باللشمانيا الجلدية الكبرى (*L. major*) والاشخاص الاصحاء عند المعاملة بعقار البنتوستام وفي فترة العلاج

الكلوبيولين المناعي	ايام العلاج			
	0	7	14	21
IgG	**1790.5 ± 51.7**	**1550.3 ± 59.4**	**1140.4 ± 45.5**	**899.1 ± 85.5**
IgM	**156.8 ± 15.9**	**150.7 ± 18.1**	**139.6 ± 13.8**	**129.4 ± 18.1**

* لم يكن هناك فرق معنوي بين المعاملة الأخيرة ومجموعة السيطرة

- مستويات الغلوبيولينات المناعية الكلية IgG وIgM لدى المصابين بطفيلي اللشمانيا الجلدية المدارية (*L-tropica*) بتقنية الاليزا (ELISA)

جدول (9) يوضح معدل التراكيز SE ± (ملغم / د.لتر) للاميونوكلوبيولين IgG و IgM في امصال (31) مريض مصاب باللشمانيا الجلدية المدارية (*L.tropica*) والاشخاص الاصحاء

الكلوبيولين المناعي	مجموعة السيطرة	المصابين	P- value
IgG	665.0 ± 142.3	1722.1 ± 524.0	< 0.05
IgM	126.1 ± 28.0	182.9 ± 25.3	< 0.05

جدول (10) يوضح معدل التراكيز SE ± (ملغم / د.لتر) للاميونوكلوبيولين IgG و IgM في امصال (31) مريض مصاب باللشمانيا الجلدية المدارية (*L.tropica*) والاشخاص الاصحاء عند المعاملة بعقار البنتوستام وفي فترة العلاج

الكلوبيولين المناعي	ايام العلاج			
	0	7	14	21
IgG	1655.5 ± 41.2	1430.3 ± 49.1	1150.4 ± 35.9	1099.1 ± 45.3
IgM	166.2 ± 19.2	140.5 ± 15.6	137.7± 14.6	± 17.2 130.0

* لم يكن هناك فرق معنوي بين المعاملة الأخيرة ومجموعة السيطرة

- مستويات الحركيات الخلوية لدى المصابين بطفيلي اللشمانيا الجلدية الكبرى (*L. major*)

جدول (11) معدل تراكيز السايتوكينات SE ± لـ (94) مريض مصاب باللشمانيا الجلدية الكبرى (*L. major*) ومجموعة السيطرة الاصحاء

نوع السايتوكين	مجموعة السيطرة	المصابين	P- value
IFN- γ ملغم / د.لتر	6.55±2.2	113.2±5.5	< 0.05
IL-10 ملغم / د.لتر	6.92±4.4	215.0±9.8	< 0.05

جدول (12) يوضح مستويات المصل بالملغم /د. لتر لكل من IFN- γ و IL-10 لـ (94) مصاب باللشمانيا الجلدية الكبرى مقاس بتقنية الاليزا قبل وخلال وبعد العلاج

نوع السايتوكين	ايام العلاج			
	0	7	14	21
IFN- γ	110.3 ± 5.3	19.21 ± 3.7	8.17 ± 3.9	6.05±3.0
IL-10	202.3 ± 8.9	56.03 ± 9.1	18.99 ± 8.7	9.02±5.1

* لم يكن هناك فرق معنوي بين المعاملة الأخيرة ومجموعة السيطرة

- مستويات الحركيات الخلوية لدى المصابين بطفيلي اللشمانيا الجلدية المدارية (*L.tropica*)

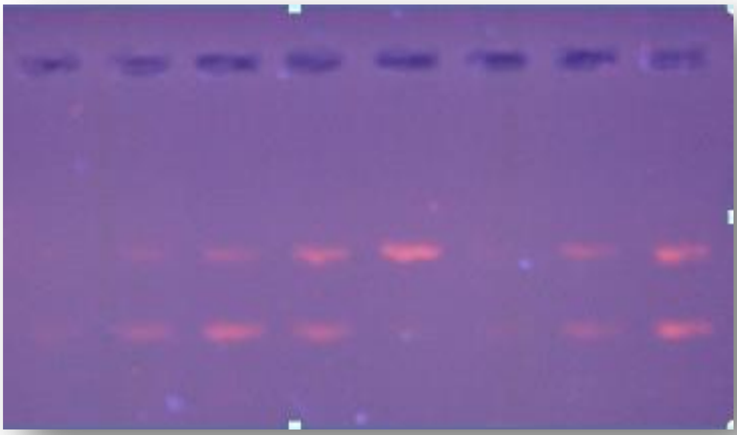
جدول (13) معدل تراكيز السايتوكينات SE ± لـ (31) مريض مصاب باللشمانيا الجلدية المدارية (*L. tropica*) ومجموعة السيطرة الاصحاء

نوع السايتوكين	مجموعة السيطرة	المصابين	P- value
IFN- γ ملغم / د.لتر	7.33±2.5	88.2±6.5	< 0.05
IL-10 ملغم / د.لتر	11.52±5.4	115.0±8.8	< 0.05

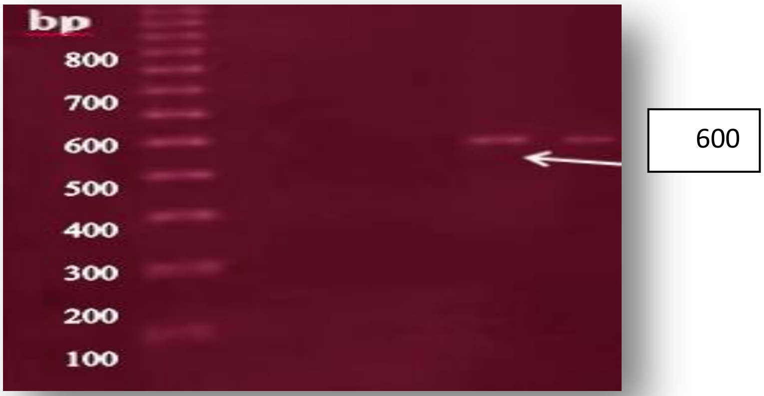
جدول (14) يوضح مستويات المصل بالملغم /د. لتر لكل من IFN- γ و IL-10 لـ (31) مصاب باللشمانيا الجلدية المدارية مقاس بتقنية الاليزا قبل وخلال وبعد العلاج

نوع السايتوكين	ايام العلاج			
	0	7	14	21
IFN- γ	77.3 ± 4.3	20.21 ± 2.7	11.17 ± 3.5	7.05±3.1
IL-10	101.3 ± 7.1	66.03 ± 8.8	20.99 ± 7.7	11.02±5.1

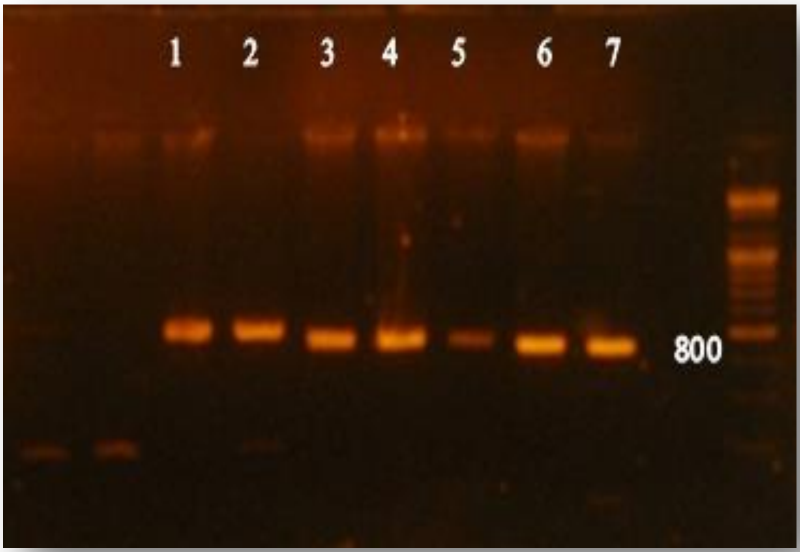
* لم يكن هناك فرق معنوي بين المعاملة الأخيرة ومجموعة السيطرة



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



صورة (2) الترحيل الكهربائي لنتائج تنميط 6 عزلات من (*Leismania major*) 600 pb بواسطة تقنية الـ PCR



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

المناقشة Discussion

تظهر الحالة المرضية بداء اللشمانيّا الجلدية مع بداية الخريف وفي اشهر الشتاء وهذه تتطابق مع ما حصل عليه (18) و (19) وربما ترجع هذه النتائج الى نشاط حشرة الحرمس والظروف البيئية الملائمة لها ولا سيما ما يتعلق بدرجات حرارة المحيط (20) .

وكما اظهرت النتائج ان النوع الاكثر انتشارا في المحافظة من اجناس اللشمانيا هي اللشمانيا الكبرى *L. major* اذ اعطت نسبة مئوية اعلى مما هي في اللشمانيا المدارية *L.tropica* مع تفوق الذكور على الاناث في كلا النوعين واتفقت هذه النتائج مع دراسة (21) .

يتم اللـجوء في الـوقت الحاضـر الى التشـخيص بتـقنية جـديدة (22) ظهرت اساليب متنوعة يعتمد المبدا الجوهري فيها على اسس كيميائية حيوية وجزيئية لتحديد انواع اللشمانيا بشكل اكثر دقة والطريقة الاكثر شيوعا في الوقت الحاضر هي التقنيات المعتمدة على الحامض النووي وذلك باستخدام تقنية PCR .

تتصف تقنية PCR بدقتها العالية نظراً لنوعية القواعد المستخدمة في التفاعل والتي ترتبط في مكان محدد من DNA المدروس، كما تتميز هذه الطريقة بحساسيتها المرتفعة ، حيث تسمح بالكشف عن أعدادٍ قليلة جداً من الطفيلي ويمكن إنجازها ، كما هي الحال في هذه الدراسة ، على كمية قليلة جداً من DNA المستخلص (بحدود ng50). ولقد اعتمدت بعض الدراسات على هذه التقنية للكشف عن داء اللشمانيات الحشوي، بتحليل عينات من الدم المحيطي رغم احتوائها على عددٍ قليل من الطفيليات (23) و (24).

ويعد PCR تفاعلاً سريع الإنجاز في حال توفر المواد والأجهزة اللازمة. ومجمل هذه الصفات تجعل منه تفاعلاً يتفوق على كل الطرق التقليدية المستخدمة في تحديد نوع الطفيلي. إذ تعد التفاعلات المصلية أو المناعية ، وخاصة باستخدام الأضداد وحيدة

النسيلة منخفضة النوعية نظراً للتشابه الكبير في الكثير من المستضدات العائدة للأنواع المختلفة للطفيلي ، مما يؤدي إلى حدوث تفاعلات تصالبية تعطي نتائج تنميط غير دقيقة. بينما يعد الرحلان الكهربائي عديد المواقع أو ما يعرف بالرحلان الكهربائي الأيزوإنزيمي أكثر دقة من الطرق المصلية والمناعية في تعيين نوع الطفيلي (25) .

نظراً لوجود اختلافات في التعبير الجيني الكمي والنوعي وفي بنية المستضدات بين أنواع طفيليات اللشمانيا المختلفة، وبالتالي في نمط الاستجابة المناعية المحرضة تجاهها، يُعد تعيين نوع الطفيلي المسبب للإصابة ضرورياً في الدراسات البحثية والتطبيقية التي تهدف إلى تطوير استراتيجيات تلقيحية ناجحة (26) و (27) . كما تجدر الإشارة إلى أن تعيين نوع الطفيلي خطوةً أساسية قبل القيام بأي نوع من الدراسات الجزيئية والمناعية والكيميائية الحيوية التي يمكن أن تجرى لاحقاً على هذه السلالات. كما أنه مهم في التشخيص السريري للمرض وذلك لاختيار أسلوب المعالجة الملائم والأكثر نوعية (28). واجرى العديد من الباحثين العراقيين تشخيص جزيئي باستخدام هذه PCR مؤكدين الحساسية العالية في التشخيص بهذه التقنية (29) و (30) و (31) .

وباستخدام تقانة PCR أظهرت نتائجنا أن العزلات المدروسة تنتمي بعضها لنوع اللشمانيا المدارية *L.tropica*، والنوع الاكبر منها ينتمي الى اللشمانيا الكبرى *L. major* مما يشير إلى أن هذا النوع هو المسبب الرئيس للإصابة بالداء الجلدي في منطقة الدراسة. تتوافق هذه النتائج مع ما توصلت إليه دراسة حديثة أشارت إلى الانتشار الكبير للشمانيا الكبرى بالنسبة للأنواع الأخرى من الليشمانيا (32) .

هناك العديد من التقنيات لتشخيص الامراض وتراكيز الاجسام المضادة في امصال المصابين ، وكل تقنية سجلت عليها ملاحظات سلبية بدءأ بالعزل الجرثومي حيث أشار الباحث (33) الى عدم عزل الجرثومة في الحالات الحادة عند وسط فترة تجرثم الدم .

تعد تقنية Elisa (Enzyme linked Immuno-sorbent Assay) من اكثر التقنيات المختبرية التشخيصية الواسعة الاستخدام في معظم مختبرات التحليلات المرضية و خاصة في تشخيص الفايروسات وذلك للاسباب التالية : تحليل عدد كبير من العينات ، تستغرق وقت قليل نسبيا و تعد من اكثر الفحوصات السيرولوجية حساسية لكشف الإصابة بالمرض (Sensitivity) حيث تبلغ حساسيتها 99%.حيث أشار العديد من الباحثين الى أهمية فحص الاليزا لتشخيص الامراض إذ انه يحدد طور المرض سواء إن كان مزمن أو حاد ففي دراسة مقارنة أجراها الباحثون لاحظوا إن فحص الاليزا أكثر حساسية من فحص التلازن الأنبوبي حيث إن الأخير لا يميز بين الإصابات الحادة و المزمنة في حين إن فحص الاليزا مناسب لتشخيص حالة المرض من خلال تشخيص نوع الاميونوكلوبيولين وهو فحص حساس لتحديد IgG أو IgM إذا استخدما معا،حيث اظهر نتائج متوافقة مع فحص التلازن الأنبوبي و فحص كامب و ممكن اعتماده لتشخيص المرض في الإنسان حتى وان أظهرت نتائج الكامب سالبة لكونه فحص سهل و موثوق ويؤدي الى أفضل النتائج ذات العلاقة بالعلامات السريرية .

اشارت النتائج الى ارتفاع معدلات قيم الاميونكلوبيولين (IgG وIgM) في امصال المرضى المصابين باللشمانيا الجلدية بنوعيها (الكبرى والمدارية) ، وقد يعود سبب هذا الارتفاع الى تنشيط polyclonal لخلايا B وهذا بسبب تحفيز مستضدات اللشمانيا التي تحفز نمو وتمايز proliferation and differentiation خلايا B وتحولها الى خلايا بلازمية plasma cells تفرز الاجسام المضادة ، ايضا السايتوكينات المفرزة من الخلايا كخلية T – helper والمسؤولة عن تنظيم عوامل بدأ التنشيط لخلايا B ، الانترفسيرون – كاما Interferon-γ يفرز اولا من خلايا Th1 لتحفيز انتاج المتمم المثبت للاجسام المضادة IgG2 and IgG3 . (34) . في حين ان سايتوكينات خلايا Th 2 وهي IL - 4 and IL – 5 ايضا شخصت كمساعدات لخلايا B اللمفاوية وتحفيز انتاج مستويات عالية من IgE و IgM والمتمم الغير مثبت للجسم المضاد البشري IgG4 (35) .

أدى العلاج في الحد من قيمة متوسط الكلوبولين المناعي IgM و IgG ، بينما كانت لا تزال قيمتها أعلى من مجموعة السيطرة ، وهذه النتيجة تتفق مع (36) الذي اشار الى أن زيادة مستويات الأجسام المضادة للشمانيا قد تكون موجودة لفترة طويلة بعد العلاج .

في معظم الامراض الطفيلية تقدم الاستجابة المناعية الخلوية (Th1) Cellular Response او الخلطية Humeral Response (Th2) السيطرة الافضل على مسببات الامراض ، ان استجابة الخلية المساعدة ضروري في تحديد رد فعل المناعي الناجح ، وان لخلية Th 1 وسائط مؤثرة في الحساسية المتأخرة DTH وافراز الانترليوكين -2 (IL – 2) وانترفيرون- كاما (IFN – γ) ، فهي مؤثرات رئيسي في المناعة التي تتوسطها الخلايا cell – mediated immunity (37) .

وبالمقابل فان خلية Th 2 لا تنقل للـ DTH لكنها تنتج IL - 4، IL - 5، IL - 6 و IL - 10 وتتعاون مع خلية B لتوليد الكلوبولين المناعي، IgA، IgG و IgE كاستجابة (38) .

وادت نتائج IL - 10 التي حصل عليها (39) التي ذكر فيها ان المرضى المصابين باللشمانيا تصل الزيادة عندهم في افراز IL – 10 كاستراتيجية مهمة لتثبيط تنظيم استجابة خلايا T . ان الاصابة باللشمانيا الجلدية معروفة بحثها على الافراز الداخلي للانترليوكين -10 كميكانيكية للتطفل وذلك لان IL – 10 يبدو انه مسؤول عن تثبيط صناعة الانترفيرون – كاما ((IFN – γ) السايتوكين الرئيسي المحفز للخلايا الملتهمة macrophage ويشترك في الدفاعات ضد اللشمانيا والذي يسهل بقاء الطفيلي حيا داخل الخلايا وذلك من خلال تثبيط الاستجابة التأكسدية والالتهابية (40).

تم الكشف عن مستويات عالية من الانترفيرون – كاما (IFN – γ) في مصل المرضى المصابين باللشمانيا الجلدية CL مقارنة مع السيطرة . ان المستويات العالية من (IFN –γ) ضرورية للحفاظ على التوازن بين استجابة كل من Th1 و Th2 . هذه النتائج جاءت مطابقة لباحثين سابقين ، الذي وجد بان اختلاط الاستجابة Th1/Th2 للطفيليات نوعي لخلية T لكلا الاصابة بالنسبة للشمانيا سواء كانت حالة حادة او مزمنة .(41)

لاحظ (42) بان الارتفاع الملحوظ لكل من IL – 10 و IFN –γ موجود في المصابين باللشمانيا الجلدية . اشارت دراسات في امريكا على اللشمانيا الجلدية CL الى ان IL – 2 و IFN –γ تنتج عند غياب التحفيز بانتجينات اللشمانيا ، ايضا (43) لاحظ ان IL – 10 اوقف تنشيط Th1 وبالتالي الاستجابة السمية من خلال تثبيط تنظيم انتاج IL-12 ، IFN –γ ، IL-10 ايضا يثبط تنشيط الخلايا الملتهمة Macrophage ويقلل من قابلية هذه الخلايا في قتل اللشمانيا .

ان الكثير من البيانات دعمت بحقائق مثيرة للاهتمام حول الخلل في التوازن بنسبة Th1:Th2 باتجاه سيادة استجابة Th2 في مجموعة المصابين بـ CL ، واخذت بنظر الاعتبار مستويات IL – 10 و IFN –γ ، حيث لوحظت نسبة عالية من IL – 10/ IFN- γ . ان انخفاض مستوى IL – 10 يتبع فترة العلاج واكتشاف IFN – γ في الحالات الحادة وعند المرضى المعالجين سجلت ايضا . وهكذا اقترح بان وجود IL – 10 أقل من غياب IFN- γ هو من صفات الاصابة باللشمانيا (44) .

واخيرا فان مفهوم Th1/Th2 لايمكن حسابه بشكل تام وكامل بسبب التعقيد الحقيقي داخل الكائن الحي (in vivo) حيث ان بقاء الطفيلي حيا يعتمد على ميكانيكيات مختلفة بدلا من الفكرة العامة لتجاهل نوع من انواع الاستجابة سواء Th1 او Th2 . وان الفشل في السيطرة او ايجاد الحلول للامراض المعدية غالبا ما تكون نتائجه غيرملائمة والاهم من ذلك الاستجابة المناعية الكافية (45).

المصادر

1. World Health Organization WHO. (2000). The leishmaniasis and Leishmania / HIV co-infection. Fact sheet No. 116. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
2. Mohebali, M.; Motazedian, M.H.; Parsa, F.; Hajjaran, H.(2002). Identification of *Leishmania* species from different parts of Iran using a random amplified polymorphic DNA in human, animal reservoirs and vectors. Med J Islamic R Iran, 15(4):243-46.
3. Rasheed, Z.N. (2004). *Leishmaniasis* in Iraq. *Leishmania* and zoonotic disease section. Communicable Disease Control Center CDC/Baghdad/Iraq.
4. Mahmoodi, M.; Mohajery, M.; Afshari, J.; Shakeri, M. panah ,M. ;Berenji, F; and , A.(2010).Molecular identification of Leishmania species causing cutaneous *Leishmaniasis* in Mashhad, Iran. Jundishapur.J Microbiol. 3(4): 195-200.
5. Nadim, A. ; Azizi, F.(2000). Epidemiology and control of prevalent diseases in Iran. Iran, 2nd ed., Iran, Publications of Payam Noor University, 524-32.
6. Lainson , R. and J. J. Shaw . (1987). Evaluation , Classification and Geographic distribution in Peters , W.Killick –Kendrick R. eds. The *Leishmaniasis* in Biology and Medicine (London; Academic Press) 1 – 120 .
7. Peters , W. and R. Killick – Kendrick .(1987) . The *Leishmaniasis* in Medicine, Academic Press : London.
8. Alexander B.; Mc .Usma ; H.Candena ; Bl. Quesada , Y. Solarte , W. Roa, Bl. Travi. (1995). Evaluation impregnated bendents and cutains against *Phlebotomine* Sand flies in Valle del Cauca .Colombia .Entomol;, pp. 279 -283.
9. Asgari, Q.; Motazedian, M.H. ; Mehrabani, D. ; Oryan, A.; Hatam, G.R.; Owji, S.M.; Paykari, H. (2007) . Zonotic *cutaneous Leishmaniasis* in Shiraz Iran: a molecular, isoenzyme and morphologic aproach. J Res Med Sci. 12: 7–15.
10. Azizi, K. ; Davari, B. ; Kalantari, M. ; Fekri, S. (2011). Gerbilid rodents fauna (Muridae: Gerbilinae) and detection of reservoir hosts(s) of zonotic *cutaneous Leishmaniasis* using a nested-PCR technique in Jask city in Hormozgan Province in 208. Sci J Kurdistan Univ Med Sci.16: 6–76.
11. AL- Aubaidi, I. Kasim. (2007). Effect of some plant extracts on growth and viability of cutaenous and visceral *Leishmania* parasites in vitro and in vivo. A thesis of Ph.D. degree Department of Parasitology, College of education Ibn Al-Haitham, University of Baghdad, Baghdad, Iraq.
12. World Health Organization WHO. (2008). Leishmaniasis: *cutaenous leishmaniasis* reports "consultative meeting on *cutaneous Leshmaniasi*s " WHO Headquarters, from 30 April to 2 May2007 WHO/HTM/NTD/IDM. Leishmaniasis Control Programme, Geneva.
13. World Health Organization WHO.(2009a). Leishmaniasis. Magnitude of the problem .
14. Khalaf, Chassan Jabar. (2010). Epidemiological and experimental study of *Visceral Leishmaniasis* in Wassit governorate. M.S.c thesis submitted to Collage of Veterinary Medicine, University of Al-Qadisiya . Qadisiya, Iraq.

15. Kagan , I. G. & L .Norman . (1970) . Normal of Clinical Microbiology . Am. Soc. Microbial. Washington . p. 479 .
16. Adler , S. & O. Theodor .(1930) . Investigation on Mediterranean Kala –azar IX. Feeding experiments with P. pernicous and other species on animals infected with L. infantum Proc. Roy .Soc. London .B. 116: 505 -515 .
17. Sambrook,J. ; Fritsch,E.F.; and Maniatis,T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual . 2nd edition, Cold spring harbor laboratory press,cold spring Harbor, New York.
18. Rahim, G. and Tatar, I. (1966): Oriental sore in Iraq .IBID, 8-29.
19. Tayeh , A., L. Jalouk , and S. Cairncross . (1997) . Twenty years of *Cutaneous Leishmaniasis* in Aleppo. Syria. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 9 (6): 657 – 659.
20. Talari, S.; Shajari, G. and Talaei, R. (2009). Clinical finding of cutaneous leishmaniasis as a new focus of Iran. Internet J. Inf. Dis. 5:1-5.
21. Giannini, M.S. H.(1996). Sex-influenced response in the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis in mice. Parasite Immunol. (8): 31–7.
22. Deborggraeve, S.; Boelaert, M.; Rijal, S.; De Doncker, S.; Dujardin, J.C.; Herdewijn, P. and Buscher, P. (2008) .Diagnostic accuracy of a new *Leishmania* PCR for clinical *visceral Leishmaniasis* in Nepal and its role in diagnosis of disease. Trop Med Int Health 13, 1378-1383.
23. Da Silva, E.S; Gontijo C.M; Pacheco Rda, S. and Brazil, R.P (2004).Diagnosis of human visceral *Leishmaniasis* by PCR using blood samples spotted on filter paper. Genet Mol Res 3, 251-257.
24. De Lima, A.C; Zampieri R.A; Tomokane T.Y; Laurenti M.D; Silveira F.T; Corbett C.E; Floeter-Winter L.M. and Gomes C.M.(2010) *Leishmania* sp. identification by PCR associated with sequencing of target SSU rDNA in paraffin-embedded skin samples stored for more than 30 years .Parasitol Res.
25. Brobey R.K; Mei F.C ; Cheng X. and Soong L. Comparative two-dimensional gel electrophoresis maps for promastigotes of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania major*. Braz J Infect Dis 10, 1-6, 2006.
26. Rohousova, I.; Ozensoy, S.; Ozbel, Y.; and Volf, P.(2005). Detection of species-specific antibody response of humans and mice bitten by sand flies. Parasitology 130, 493-499.
27. Navin, T.R; Arana, B.A; Arana, F.E.; Berman, J.D. and Chajon, J.F. (1992) .Placebo-controlled clinical trial of sodium stibogluconate (Pentostam) versus ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. J Infect Dis; 165, 528-534.
28. Motazedian, M.H. Mehrabani, D. Oryan, A. Asgari, Q. Karamian, M. Kalantari, M. (2006) . Life cycle of *cutaneous leishmaniasis* in Larestan, southern Iran. Iran J Clin Infect Dis. 1: 137–143.
29. Maraghi , S. ; Zadeh ,A.; Sarlak , A.; Ghasemian,M. and Vazirianzadeh,B.(2007). Identification of *Cutaneous Leishmaniasis* Agents by Nested Polymerase Chain Reaction (Nested-PCR) in Shush City, Khuzestan Province, Iran. Iranian J Parasitol.(2)3: 13-15.
30. Safaei, A.; Motazedian, M.H.; Vasei, M. (2002).Polymerase chain reaction for diagnosis of cutaneous leishmaniasis in histologically positive, suspicious and negative skin biopsies. Dermatology. 205(1): 18-24.
31. Baldwin, T. ; Henri, S. ; Curtis, J. ; O'Keeffe, M. ; Vremec, D. and Shortman K.(2004). Dendritic cell populations in Leishmania major-infected skin and draining lymph nodes. Infect Immun . Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Melbourne, Victoria, Australia. 72(4):1991-2001.
32. Cassataro,J.;Estein,S.M.;Pasquevich,K.A.;Velikovsky,C.A.; Barrera,S.;Bowden,R.;Fassati,C.A. and Giambartolomei,G.H.(2005). Vaccination with the recombinant Brucella outer membrane protein 31 or a derived 27-amino-acid synthetic peptide elicits a CD4+ T helper 1 response that protects against Brucella melitensis infection .. Infect. Immun. 73(12):8079-8088.
33. Snapper , C.M. and Paul , W.E. (1987): Interferon gamma and B - cells stimulatory factor - 1 reciprocally regulate Ig. Isotype production , Science ; 236 : 944 - 947 .

34. Abbas , A. K., Murphy , K. M. and Sher , A. (1996) . Functional diversity of helper T - lymphocytes . Nature ; 383 : 787 – 793 .
35. Taher,J.H. (2006) . Some biochemical and Immunological aspects of patients infected with *visceral Leishmaniasis* . thesis , College of Science , University of Babylon .
36. Perez , V. L. ; Ledere , J. A. ; Lictitman , A. H. and Abbas , A. K. (1995) : Stability of Th 1 and Th 2 population . Int. Immunol. ; 7 : 869 – 875 .
37. Finkelman , F. D. ; Holmes , J. and Katona , I. M. (1990) : Lymphokine control of vivo immunoglobulin isotypes selection. Ann.Rev. Immunol. ; 8: 303-333.
38. Margaret , M. and David , M. (2001) : The role of IL - 10 in promoting disease progression in *Leishmaniasis* . J. Immunol. ; 166 : 1141 – 1147 .
39. Bhattachary , S. ; Ghosh , S. and Majumdar , S. (2001) : Immunodulatory role of interleukin - 10 in visceral *Leishmaniasis* : defective activation of protein kinase C - mediated signal transduction events . Infection and immunity ; 69 : 1499 - 1507 .
40. Murray , H. W. ; Lu , C. M. , Freemans, and Coffman , R. L. (2002) : Interleukin - 10 in experimental *visceral leishmaniasis* and interleukin - 10 receptors blockade as immunotherapy . Infect. Immun. ; 70 : 6284 - 6293 .
41. Gomes , N. A. and Dos , R. (1998) : Unresponsive CD4 T - lymphocyte from *Leishmania chagasi* infected mice increase cytokine production and mediate parasite killing after blockade of B7 - 1/CTL - A molecular pathway . J. Infect. Dis. ; 178 - 184 .
42. Kemp , K. and Theander , T. G. (1999) . *Leishmania* specific T - cell expressing IFN - γ and IL - 10 upon activation are expanded in individual cured of VL . Clinical and Experimental Immunology ; 116 : 500 - 504 .
43. Bogdan , C. and Rollinghoff , M. (1998) : The Immune response to *Leishmania* : Mechanisms of parasite control and evasion. Int.J. Parasitol.; 28: 121 -143.
44. Ghalib , H. W. ; Piuvezam , M. R. and Skeiky , Y. A. W. (1993) . Interleukin - 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections . J. Clin. Invest. ; 92 : 329 - 342 .
45. Powire , F. and Coffman , R. L. (1993) : Cytokine regulation of T-cell function: potential for therapeutic intervention .Immunol. Today ; 14 : 270 274.