



دانشگاه پیام نور

پایان نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

در رشته بیوشیمی

دانشکده علوم پایه مرکز تهران

گروه زیست شناسی

عنوان پایان نامه:

تعیین هویت گونه های عامل لیشمانیوز پوستی به روش مولکولی

*Nested-PCR* و *RFLP* در شهرستان جهرم

استاد راهنما:

دکتر غلامرضا حاتم

استاد مشاور:

دکتر حبیب اله ناظم

مؤلف:

مهدی صادقی

بهمن ۱۳۹۰

تقدیم به :

او، روشنائی همه ی زندگیم.  
تو، آنچه در روشنائی او دیدم و باورش دارم.

استاد ارجمند و مهربانم جناب آقای دکتر غلام رضا حاتم.

مادر و مادر بزرگ مهربانم،  
که هیچ سپاسی شایسته تقدیر از مقام والایشان نیست. آنان که با صبر و گذشت خود برای ترقی ام در  
تمام طول زندگی از هیچ کوششی فروگذار نکردند و تمام موفقیت های زندگی خود را مدیون  
زحمات آنها هستم، امیدوارم خداوند به آنها پاداش نیک عنایت فرماید.

خواهر و برادر عزیزم،  
که در سختی ها و مشکلات یار و مشوق من بوده اند و همواره مدیون محبت های بی دریغشان  
هستم.

خواهرزاده عزیزتر از جانم،

و همه ی معلمان و استادان دلسوزی که در دوران تحصیل، صمیمانه برایم تلاش کردند.

اکنون که این تحقیق، در سایه الطاف بیکران الهی پایان پذیرفت، وظیفه خود می دانم از عزیزانی که مرا در این خصوص یاری کرده اند تقدیر و تشکر نمایم:

استاد ارجمند، جناب آقای دکتر حاتم که مسئولیت راهنمایی این پایان نامه را عهده دار بودند و در این راه از هیچ کوششی دریغ نورزیدند.

استاد مشاور گرامی، جناب آقای دکتر ناظم که با راهنمایی های ارزشمندشان مرا در انجام این تحقیق یاری نمودند.

جناب آقای دکتر حاج حسینی که داوری این تحقیق را به عهده داشتند.

جناب آقای کلانتری و کارکنان محترم گروه انگل شناسی دانشگاه علوم پزشکی شیراز.

جناب آقای صادقی و کارکنان محترم آزمایشگاه تخصصی مرکز بهداشت جهرم.

خالص ترین درودها تقدیم به محضر دوستان عزیز و بزرگواری که در طول دوره تحصیل محبتشان را از این حقیر دریغ نکرده اند.

و در نهایت سپاسگذارم از آنانکه در حیاتم وامدار و شرمندگی آنانم: مادر و مادربزرگ مهربانم، خواهر و برادر بزرگواریم، و خواهرزاده عزیزتر از جانم و همه اعضای خانواده که با تلاش و از خود گذشتگی، در همه مراحل زندگی به یاریم همت گماردند.

به امید توفیقات الهی

مهدی صادقی

## چکیده:

تعیین گونه های عامل لیشمانیوز پوستی به روش مولکولی Nested-PCR و RFLP در شهرستان جهرم.

لیشمانیوز یکی از بیماریهای انگلی است که توسط تک یاخته ای از جنس لیشمانیا ایجاد می گردد و به صورت گسترده، در مناطق مختلفی از جهان مشاهده می شود. این بیماری دارای طیف وسیعی بوده که از یک طرف به ظاهر زخمی ساده و از طرف دیگر طیف اشکال پوستی، پوستی مخاطی و لیشمانیوز احشایی را شامل می شود که حتی می تواند منجر به مرگ گردد. عوامل لیشمانیوز دارای میزبان مخزن از مهره داران و همین طور میزبان ناقل مرسوم به پشه خاکی می باشد. لیشمانیوز پوستی و احشایی به صورت اندمیک در قسمتهایی از ایران دیده می شود.

در این تحقیق تعیین گونه لیشمانیا مولد لیشمانیوز پوستی به کمک تکنیک های Nested-PCR و تایید با روش RFLP صورت گرفت که در این مطالعه از ۱۶۴ بیمار مبتلا به لیشمانیوز پوستی در شهرستان جهرم نمونه گیری شد. در نمونه گیری برای مشاهدات میکروسکوپی از زخم گسترشی بر روی لام تهیه شد و با رنگ آمیزی گیمسا وجود انگل لیشمانیا بررسی شد که ۱۳ لام از نظر مشاهده انگل منفی و ۱۵۱ مورد مثبت گزارش شد. از روش Nested-PCR به عنوان روش اصلی جهت تعیین گونه انگل جدا شده از بیماران استفاده شد که در این روش از پرایمر های CSB2XF, CSB1XR در راند اول و از پرایمرهای 3Z, LIR در راند دم استفاده شد. نتایج حاصل از Nested-PCR نشان داد که انگل های جدا شده از بیماران در ۱۲ مورد لیشمانیا تروپیکا و ۱۵۲ مورد لیشمانیا میجر هستند که در مقایسه با روش مشاهده میکروسکوپی این روش دقیق و قابل اعتماد میباشد. از روش RLFP برای تایید Nested-PCR از آنزیم HaeIII استفاده شد که نتایج حاصل RFLP الگوی صحیحی از لیشمانیای در گیر کننده منطقه و تاییدی بر Nested-PCR برای شناسایی گونه های لیشمانیا ارایه داد. مطالعات در این منطقه با روش های دقیق فوق الذکر نشان داد که گونه غالب و شایع منطقه لیشمانیا میجر است ولی گونه لیشمانیا تروپیکا نیز مناطق شهری شهرستان جهرم را درگیر کرده است و هر گونه اقدامات کنترلی در این منطقه باید براساس قطع کردن چرخه زندگی انگل صورت پذیرد.

## فهرست مطالب:

۱	فصل اول: مقدمه
۲	۱-۱- پیشگفتار.....
۴	۲-۱- کلیاتی در مورد لیشمانیوز.....
۴	۱-۲-۱- تعریف لیشمانیوز.....
۴	۲-۲-۱- تاریخچه.....
۵	۳-۲-۱- طبقه بندی انگل لیشمانیا.....
۶	۴-۲-۱- مورفولوژی و سیر تکامل لیشمانیا.....
۱۲	۳-۱- اشکال مختلف بیماری لیشمانیوز.....
۱۲	۱-۳-۱- لیشمانیوز احشایی.....
۱۲	۲-۳-۱- لیشمانیوز پوستی (جلدی).....
۱۳	۱-۲-۳-۱- لیشمانیوز پوستی شهری (خشک) یا انسان دوست (ACL).....
۱۴	۲-۲-۳-۱- لیشمانیوز مزمن راجعه (LR).....
۱۴	۳-۲-۳-۱- لیشمانیوز پوستی روستایی (مرطوب) یا حیوان دوست (ZCL).....
۱۵	۴-۲-۳-۱- لیشمانیوز پوستی در اثر ل. اتیوپیکا.....
۱۵	۳-۳-۱- لیشمانیوز پوستی منتشر (DCL).....
۱۵	۴-۳-۱- لیشمانیوز پوستی مخاطی (MCL).....
۱۶	۴-۱- مخزن انگل لیشمانیا.....
۱۶	۱-۴-۱- تعریف مخزن.....
۱۶	۲-۴-۱- انواع میزبانان مخزن.....
۱۸	۵-۱- ناقل بیماری لیشمانیوز.....
۲۰	۱-۵-۱- شکل خارجی.....
۲۱	۲-۵-۱- دوره زندگی.....
۲۱	۳-۵-۱- عادات رفتاری بالغ.....
۲۲	۶-۱- روش های تشخیص لیشمانیوز.....
۲۲	۷-۱- روش های تعیین هویت انگل.....

- ۲۳-۱-۷-۱ پروب های DNA یا هیپریداسیون..... ۲۳
- ۲۳-۲-۷-۱ استفاده از آنتی بادی های مونوکلونال..... ۲۳
- ۲۳-۳-۷-۱ بررسی ایزوآنزیم ها..... ۲۳
- ۲۵-۴-۷-۱ اهمیت استفاده از کشت های سلولی در مطالعات بر روی لیشمانیا..... ۲۵
- ۲۵-۵-۷-۱ واکنش زنجیره ای پلی مرا (PCR)..... ۲۵
- ۲۵-۶-۷-۱ کاربرد PCR در شناسایی انگل های لیشمانیا..... ۲۵
- ۲۶-۱-۶-۷-۱ به کارگیری آغازگرهای اختصاصی..... ۲۶
- ۲۶-۲-۶-۷-۱ روش تکثیر تصادفی ناهمگون DNA با استفاده از PCR..... ۲۶
- ۲۷-۱-۲-۶-۷-۱ واکنش استاندارد RAPD - PCR..... ۲۷
- ۲۷-۸-۱ اصول کنترل و پیشگیری بیماری..... ۲۷
- ۲۸-۹-۱ کنترل ناقلین..... ۲۸
- ۲۹-۱۰-۱ کنترل مخازن حیوانی..... ۲۹
- ۲۹-۱۱-۱ بیماری یابی و درمان..... ۲۹
- ۳۰-۱۲-۱ واکسیناسیون..... ۳۰
- ۳۱-۱۳-۱ اصول نوپدیدی و بازپدیدی بیماری ها و عوامل موثر بر آن..... ۳۱
- ۳۱-۱-۱۳-۱ گذار اپیدمیولوژیک..... ۳۱
- ۳۲-۲-۱۳-۱ بیماری های نوپدید..... ۳۲
- ۳۲-۳-۱۳-۱ بیماری های بازپدید..... ۳۲
- ۳۳-۴-۱۳-۱ عوامل موثر بر نوپدیدی و بازپدیدی بیماری ها..... ۳۳
- ۳۴-۵-۱۳-۱ تاثیر تغییرات دموگرافیک بر نوپدیدی و بازپدیدی بیماری ها..... ۳۴
- ۳۴-۶-۱۳-۱ تغییرات اکولوژیک شهر..... ۳۴
- ۳۴-۷-۱۳-۱ تغییرات محیطی..... ۳۴
- ۳۵-۸-۱۳-۱ فعالیت های اقتصادی و مسافرت..... ۳۵
- ۳۵-۹-۱۳-۱ تغییر در عفونت زایی، حدت و قابلیت انتقال..... ۳۵
- ۳۵-۱۰-۱۳-۱ نوپدیدی ارگانسیم های مقاوم به آنتی بیوتیک ها..... ۳۵
- ۳۵-۱۱-۱۳-۱ حساسیت میزبان نسبت به عوامل نوپدید و بازپدید..... ۳۵
- ۳۶-۱۴-۱ سیستم اطلاعات جغرافیایی (GIS) و کاربرد آن در انگل شناسی..... ۳۶
- ۳۷-۱۵-۱ موقعیت جغرافیایی و ویژگی های استان فارس..... ۳۷

۳۸	۱۶-۱- نستد پی سی آر (Nested-PCR).....
۳۹	۱۷-۱- تکنیک RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).....
۴۰	۱۸-۱- ساختمان ژنوم انگل لیثمانیا.....
۴۱	۱۹-۱- روش های تعیین هویت انگل لیثمانیا.....
۴۱	۱-۱۹-۱- روش های فنوتیپی و ایمونولوژیک.....
۴۲	۲-۱۹-۱- روش های ملکولی.....
۴۴	۲۰-۱- اپیدمیولوژی و اهمیت بهداشتی لیثمانیوز.....
۴۴	۱-۲۰-۱- اپیدمیولوژی و اهمیت بهداشتی لیثمانیوز در جهان.....
۴۵	۲-۲۰-۱- اپیدمیولوژی و اهمیت بهداشتی لیثمانیوز در ایران.....
۴۶	۱-۲-۲۰-۱- لیثمانیوز پوستی.....
۴۷	۲۱-۱- بیان مسئله و اهداف مطالعه.....
۴۸	۱-۲۱-۱- اهداف و فرضیات.....
۴۹	۲-۲۱-۱- نوع مطالعه.....
۴۹	۲۲-۱- اهمیت و هدف از انجام این تحقیق.....

## ۵۱ فصل دوم: مروری بر مطالعات و تحقیقات گذشته

۵۲	مروری بر مطالعات انجام شده با PCR و RFLP جهت تعیین مشخصات انگل لیثمانیا.....
----	--

## ۵۸ فصل سوم: مواد و روش ها

۵۹	۳-۱- مواد، روش ها و اصول کار در Nested-PCR و RFLP.....
۵۹	۳-۱-۱- جدا سازی انگل لیثمانیا از زخم های جلدی بیماران.....
۵۹	۳-۱-۲- رنگ آمیزی نمونه ها برای مطالعه میکروسکوپی.....
۵۹	۳-۱-۳- مواد و وسایل مورد نیاز.....
۶۱	۳-۱-۴- روش استخراج DNA.....
۶۲	۳-۱-۵- روش اندازه گیری غلظت DNA در محلول.....
۶۳	۳-۱-۶- روش انجام Nested-PCR اختصاصی.....
۶۴	۳-۱-۶-۱- مواد لازم جهت این Nested-PCR راند اول.....

- ۳-۱-۶-۲ - مواد لازم جهت این Nested-PCR راند دوم..... ۶۵
- ۳-۲- مواد و وسایل لازم جهت انجام PCR-RFLP ..... ۶۶
- ۳-۳- تعیین غلظت DNA به کمک الکتروفورز..... ۶۶
- ۳-۳-۱- مواد و وسایل لازم..... ۶۷
- ۳-۳-۲- روش کار..... ۶۷
- ۳-۴- روش عکسبرداری با Gel Document..... ۶۸

## ۷۰ فصل چهارم: نتایج

### ۹۵ فصل پنجم: بحث

- ۵-۱- استفاده از Nested-PCR به منظور تعیین گونه انگل..... ۹۶
- ۵-۲- بررسی نتایج بدست آمده بر اساس جنسیت افراد مورد مطالعه..... ۹۷
- ۵-۳- بررسی نتایج بدست آمده بر اساس سن افراد مورد مطالعه..... ۹۷
- ۵-۴- بررسی نتایج بدست آمده بر اساس مکان زندگی افراد مورد مطالعه..... ۹۷
- ۵-۵- بررسی نتایج بدست آمده بر اساس مسافرت به مناطق آلوده در افراد مورد مطالعه..... ۹۸
- ۵-۶- بررسی نتایج بدست آمده بر اساس نوع ضایعه در افراد مورد مطالعه..... ۹۸
- ۵-۷- بررسی نتایج بدست آمده بر اساس تعداد ضایعه در افراد مورد مطالعه..... ۹۸
- ۵-۸- بررسی نتایج بدست آمده بر اساس محل ضایعه در افراد مورد مطالعه..... ۹۸
- ۵-۹- بررسی نتایج بدست آمده بر اساس سابقه قبلی بیماری لیشمانیوز در افراد مورد مطالعه..... ۹۹
- ۵-۱۰- بررسی نتایج بدست آمده بر اساس مشاهدات میکروسکوپی در افراد مورد مطالعه..... ۹۹
- ۵-۱۱- بررسی نتایج بدست آمده بر اساس تعداد انگل در مشاهدات میکروسکوپی در افراد مورد مطالعه..... ۹۹
- ۵-۱۲- بررسی نتایج بدست آمده بر اساس شهر یا روستا در افراد مورد مطالعه..... ۹۹
- ۵-۱۳- بررسی نتایج بدست آمده بر اساس بخش در افراد مورد مطالعه..... ۹۹
- ۵-۱۴- بررسی نتایج بدست آمده بر اساس RFLP در افراد مورد مطالعه..... ۱۰۰
- ۵-۱۵- پیشنهادات..... ۱۰۰



- ۱۱۰ پیوست ها
- ۱۱۱.....ضمیمه ۳-۱- روش تهیه بافرها و محلول های مورد استفاده در PCR
- ۱۱۱.....۳-۱-۱ لیزین بافر با  $\text{pH} = 8$
- ۱۱۱.....۳-۱-۲ فنل / کلروفرم (1:1 V/V)
- ۱۱۱.....۳-۱-۳ فنل / کلروفرم / ایزوآمیل (25:24:1 V/V)
- ۱۱۱.....۳-۱-۴ بافر TAE با  $\text{pH} = 8$
- ۱۱۱.....۳-۱-۵ محلول اتیدیوم بروماید
- ۱۱۱.....۳-۱-۶ ژل الکتروفورز ۱/۵ درصد
- ۱۱۲.....ضمیمه ۳-۲- طرز تهیه ژل های مورد نیاز در الکتروفورز
- ۱۱۲.....۳-۲-۱ ژل جداکننده
- ۱۱۲.....۳-۲-۲ ژل متراکم کننده

## فهرست شکل ها:

- شکل ۱-۱- مرحله آماسیتیگوت (جسم لشمین) انگل لیشمانیا..... ۷
- شکل ۱-۲- مرحله پروماستیگوت (لپتوموناد) انگل لیشمانیا..... ۸
- شکل ۱-۳- قسمت های مختلف دستگاه گوارش پشه خاکی..... ۱۰
- شکل ۱-۴- چرخه زندگی انگل لیشمانیا..... ۱۱
- شکل ۱-۵- زخم نوع شهری (خشک)..... ۱۳
- شکل ۱-۶- زخم نوع روستایی (مرطوب)..... ۱۴
- شکل ۱-۷- مخزن انگل لیشمانیا..... ۱۷
- شکل ۱-۸- جوندگان مخزن انگل لیشمانیا..... ۱۷
- شکل ۱-۹- ناقل انگل لیشمانیا..... ۱۹
- شکل ۱-۱۰- دوره زندگی و ساختمان خارجی مراحل زندگی پشه خاکی..... ۲۰
- شکل ۱-۱۱- انتشار جهانی لیشمانیوز پوستی..... ۴۵
- شکل ۱-۱۲- انتشار و نوع کانون های لیشمانیوز پوستی در ایران..... ۴۷
- شکل ۳-۱-PCR تانک الکتروفورز..... ۶۹
- شکل ۳-۲- دستگاه عکسبرداری..... ۶۹
- شکل ۴-۱- عکس گرفته شده از بیمار ۱۷ ساله با زخم های متعدد در صورت، در منطقه جهرم..... ۷۲
- شکل ۴-۲- عکس گرفته شده از بیمار ۷ ساله با زخم در صورت، در منطقه جهرم..... ۷۲
- شکل ۴-۳- عکس گرفته شده از بیمار ۲۶ ساله با زخم در ناحیه پا، در منطقه سیمکان جهرم..... ۷۳
- شکل ۴-۴- عکس گرفته شده از بیمار ۵۵ ساله با زخم در ناحیه سر، در منطقه جهرم..... ۷۳
- شکل ۴-۵- عکس های تهیه شده از گسترش بافتی لام های رنگ آمیزی شده و مشاهده جسم لیشمن..... ۷۴
- شکل ۴-۶- نتایج حاصل از Nested-PCR بر روی نمونه های بافتی..... ۹۱
- شکل ۴-۷- نتایج حاصل از Nested-PCR بر روی نمونه های بافتی..... ۹۲
- شکل ۴-۸- نتایج حاصل از RLFP بر روی نمونه های بافتی..... ۹۳
- شکل ۴-۹- نقشه شهرستان جهرم و روستاهای اطراف..... ۹۴
- شکل ۴-۱۰- نقشه انتشار جغرافیایی (GIS) انواع انگل لیشمانیوز پوستی شهرستان جهرم..... ۹۴

## فهرست جدول ها:

- جدول ۱-۱- آنزیم های توصیه شده توسط سازمان بهداشت جهانی برای تعیین مشخصات انگل لیشمانیا..... ۲۴
- جدول ۴-۱- نتایج میزان فراوانی بیماران مورد مطالعه بر حسب جنس..... ۷۵
- جدول ۴-۲- نتایج میزان فراوانی بیماران مورد مطالعه بر حسب سن..... ۷۵
- جدول ۴-۳- نتایج میزان فراوانی بیماران مورد مطالعه بر حسب مکان زندگی..... ۷۶
- جدول ۴-۴- نتایج میزان فراوانی بیماران مورد مطالعه بر حسب نوع ضایعه..... ۷۶
- جدول ۴-۵- نتایج میزان فراوانی بیماران مورد مطالعه بر حسب تعداد ضایعه..... ۷۷
- جدول ۴-۶- نتایج میزان فراوانی بیماران مورد مطالعه بر حسب محل ضایعه..... ۷۷
- جدول ۴-۷- نتایج میزان فراوانی بیماران مورد مطالعه بر حسب مشاهدات میکروسکوپی انگل..... ۷۸
- جدول ۴-۸- نتایج میزان فراوانی بیماران مورد مطالعه بر حسب تعداد انگل شمارش شده در زخم، در مشاهدات میکروسکوپی..... ۷۸
- جدول ۴-۹- نتایج میزان فراوانی بیماران مورد مطالعه بر حسب PCR..... ۷۸
- جدول ۴-۱۰- نتایج میزان فراوانی بیماران مورد مطالعه بر حسب شهر و روستا..... ۷۹
- جدول ۴-۱۱- نتایج میزان فراوانی بیماران مورد مطالعه بر حسب بخش..... ۷۹
- جدول ۴-۱۲- نتایج میزان شیوع لیشمانیوز بر اساس نوع انگل در بیماران مشکوک به لیشمانیوز پوستی مورد مطالعه در منطقه جهرم و روستاهای اطراف آن در دو جنس..... ۸۰
- جدول ۴-۱۳- نتایج میزان شیوع لیشمانیوز بر اساس نوع انگل در بیماران مشکوک به لیشمانیوز پوستی مورد مطالعه در منطقه جهرم و روستاهای اطراف آن بر حسب سن..... ۸۱
- جدول ۴-۱۴- نتایج میزان شیوع لیشمانیوز بر اساس نوع انگل در بیماران مشکوک به لیشمانیوز پوستی مورد مطالعه در منطقه جهرم و روستاهای اطراف آن بر حسب مکان زندگی..... ۸۲
- جدول ۴-۱۵- نتایج میزان شیوع لیشمانیوز بر اساس نوع انگل در بیماران مشکوک به لیشمانیوز پوستی مورد مطالعه در منطقه جهرم و روستاهای اطراف آن بر حسب نوع ضایعه..... ۸۳
- جدول ۴-۱۶- نتایج میزان شیوع لیشمانیوز بر اساس نوع انگل در بیماران مشکوک به لیشمانیوز پوستی مورد مطالعه در منطقه جهرم و روستاهای اطراف آن بر حسب تعداد ضایعه..... ۸۴

- جدول ۴-۱۷- نتایج میزان شیوع لیشرمانیوز بر اساس نوع انگل در بیماران مشکوک به لیشرمانیوز پوستی مورد مطالعه در منطقه جهرم و روستاهای اطراف آن بر حسب محل ضایعه..... ۸۵
- جدول ۴-۱۸- نتایج میزان شیوع لیشرمانیوز بر اساس نوع انگل در بیماران مشکوک به لیشرمانیوز پوستی مورد مطالعه در منطقه جهرم و روستاهای اطراف آن بر حسب مشاهدات میکروسکوپی..... ۸۶
- جدول ۴-۱۹- نتایج میزان شیوع لیشرمانیوز بر اساس نوع انگل در بیماران مشکوک به لیشرمانیوز پوستی مورد مطالعه در منطقه جهرم و روستاهای اطراف آن بر حسب تعداد انگل شمارش شده در زخم در مشاهدات میکروسکوپی..... ۸۷
- جدول ۴-۲۰- نتایج میزان شیوع لیشرمانیوز بر اساس نوع انگل در بیماران مشکوک به لیشرمانیوز پوستی مورد مطالعه در منطقه جهرم و روستاهای اطراف آن بر حسب شهر و روستا..... ۸۸
- جدول ۴-۲۱- نتایج میزان شیوع لیشرمانیوز بر اساس نوع انگل در بیماران مشکوک به لیشرمانیوز پوستی مورد مطالعه در منطقه جهرم و روستاهای اطراف آن بر حسب بخش..... ۸۹
- جدول ۴-۲۲- نتایج میزان شیوع لیشرمانیوز بر اساس نوع انگل در بیماران مشکوک به لیشرمانیوز پوستی مورد مطالعه در منطقه جهرم و روستاهای اطراف آن بر حسب RFLP..... ۹۰

## فهرست نمودارها:

- نمودار ۴-۱- نتایج میزان شیوع لیشمانیوز بر اساس نوع انگل در بیماران مشکوک به لیشمانیوز پوستی مورد مطالعه در منطقه جهرم و روستاهای اطراف آن در دو جنس..... ۸۰
- نمودار ۴-۲- نتایج میزان شیوع لیشمانیوز بر اساس نوع انگل در بیماران مشکوک به لیشمانیوز پوستی مورد مطالعه در منطقه جهرم و روستاهای اطراف آن بر حسب سن..... ۸۱
- نمودار ۴-۳- نتایج میزان شیوع لیشمانیوز بر اساس نوع انگل در بیماران مشکوک به لیشمانیوز پوستی مورد مطالعه در منطقه جهرم و روستاهای اطراف آن بر حسب مکان زندگی..... ۸۲
- نمودار ۴-۴- نتایج میزان شیوع لیشمانیوز بر اساس نوع انگل در بیماران مشکوک به لیشمانیوز پوستی مورد مطالعه در منطقه جهرم و روستاهای اطراف آن بر حسب نوع ضایعه..... ۸۳
- نمودار ۴-۵- نتایج میزان شیوع لیشمانیوز بر اساس نوع انگل در بیماران مشکوک به لیشمانیوز پوستی مورد مطالعه در منطقه جهرم و روستاهای اطراف آن بر حسب تعداد ضایعه..... ۸۴
- نمودار ۴-۶- نتایج میزان شیوع لیشمانیوز بر اساس نوع انگل در بیماران مشکوک به لیشمانیوز پوستی مورد مطالعه در منطقه جهرم و روستاهای اطراف آن بر حسب محل ضایعه..... ۸۵
- نمودار ۴-۷- نتایج میزان شیوع لیشمانیوز بر اساس نوع انگل در بیماران مشکوک به لیشمانیوز پوستی مورد مطالعه در منطقه جهرم و روستاهای اطراف آن بر حسب مشاهدات میکروسکوپی..... ۸۶
- نمودار ۴-۸- نتایج میزان شیوع لیشمانیوز بر اساس نوع انگل در بیماران مشکوک به لیشمانیوز پوستی مورد مطالعه در منطقه جهرم و روستاهای اطراف آن بر حسب تعداد انگل شمارش شده در زخم در مشاهدات میکروسکوپی..... ۸۷
- نمودار ۴-۹- نتایج میزان شیوع لیشمانیوز بر اساس نوع انگل در بیماران مشکوک به لیشمانیوز پوستی مورد مطالعه در منطقه جهرم و روستاهای اطراف آن بر حسب شهر و روستا..... ۸۸
- نمودار ۴-۱۰- نتایج میزان شیوع لیشمانیوز بر اساس نوع انگل در بیماران مشکوک به لیشمانیوز پوستی مورد مطالعه در منطقه جهرم و روستاهای اطراف آن بر حسب بخش..... ۸۹
- نمودار ۴-۱۱- نتایج میزان شیوع لیشمانیوز بر اساس نوع انگل در بیماران مشکوک به لیشمانیوز پوستی مورد مطالعه در منطقه جهرم و روستاهای اطراف آن بر حسب RFLP..... ۹۰

فصل اول

مقدمه

## ۱-۱- پیشگفتار

بیماری های لیشمانیوز<sup>۱</sup> از جمله بیماری های مشترک بین انسان و حیوان می باشد که توسط تک یاخته ای از جنس *لیشمانیا* ایجاد می شود. البته لیشمانیوزهای ایجاد شده توسط *لیشمانیا دونوانی*<sup>۲</sup> و *لیشمانیا تروپیکا*<sup>۳</sup> از نظر اشتراک بین انسان و حیوان مورد شک است. سه نوع اصلی شامل لیشمانیوز<sup>۴</sup> پوستی، لیشمانیوز<sup>۵</sup> احشایی و لیشمانیوز پوستی - مخاطی<sup>۶</sup> است. لیشمانیوز به وسیله گزش انواع مخصوصی از پشه خاکی های ماده انتقال پیدا می کند. این بیماری از قدیم در ایران شناخته شده بود و در قرن ۵ هجری توسط بوعلی سینا شرح داده شده است. عوامل اصلی ایجاد این بیماری در دنیای قدیم *لیشمانیا میجر*، *لیشمانیا تروپیکا* و *لیشمانیا اتیوپیکا* است. در ایران دو نوع اول و در مواردی *لیشمانیا اینفانتوم* عامل بیماری شناخته شده است. این شکل بیماری در مناطق مختلف جهان به خصوص در ایران یافت می شود که هر کدام از گونه ها بوسیله مخزن آلوده کننده از یکدیگر جدا شده اند. به طور مثال مخزن *ل. میجر*، *ل. تروپیکا* و *ل. اتیوپیکا*، انسان و سگ می باشد. *ل. دونوانی* و *ل. اینفانتوم* گاهی نیز ایجاد لیشمانیوز پوستی (جلدی) می نمایند. لیشمانیوز پوستی در کانون های مختلف کشور از هر دو نوع روستایی (مرطوب) و نوع شهری (خشک) وجود دارد. میزان ورود بیماری از سال ۶۲ تا ۷۷ همواره از ۲۰ تا ۴۰ مورد در ۱۰۰ هزار جمعیت نوسان داشته است (۱).

عوارض بالینی لیشمانیوز بسته به گونه ایجاد کننده شامل ضایعات پوستی، پوستی - مخاطی، پوستی منتشره و احشایی می باشد. این انگل ها گاهی می توانند به صورت نهفته تا سال ها در بدن میزبان بدون علائم باقی مانده و تحت شرایط خاص از جمله ضعف سیستم ایمنی مثل بیماری ایدز، مهاجم شده، علائم خاص خود را بروز دهند (۱).

دو فرم اپیدمیولوژیک در این بیماری وجود دارد :

زئونوتیک<sup>۷</sup> : که مخازن حیوانی در چرخه انتقال دخالت دارند. در اینجا با توجه به اینکه حیوانات مخزن آلودگی هستند کنترل بیماری به سختی صورت می گیرد (۱).

<sup>1</sup> Leishmaniasis

<sup>2</sup> *Leishmania donovani*

<sup>3</sup> *Leishmania tropica*

<sup>4</sup> Cutaneous Leishmaniasis (CL)

<sup>5</sup> Visceral Leishmaniasis (VL)

<sup>6</sup> Muco Cutaneous Leishmaniasis (MCL)

<sup>7</sup> Zoonotic

آنتروپونوتیک<sup>۱</sup>: در این جا انسان مخزن اصلی و منبع آلودگی برای ناقل است و به همین دلیل کنترل بیماری در این کانون ها نسبت به نوع قبلی آسان تر است زیرا با درمان بیماران می توان گام مؤثری در کنترل بیماری برداشت (۱).

در موارد متعددی در دنیا یک افزایش مشخص در تعداد موارد بیماری مشاهده می شود. این موارد افزایش، در ارتباط مستقیم با توسعه اقتصادی و همچنین تغییرات رفتاری و محیطی است که سبب افزایش تماس بین انسان با پشه خاکی می شود. مثلاً استقرار در مستعمره های جدید، اسکان در جنگل ها، جنگل زدایی، مهاجرت از روستا به مناطق شهری، شهرسازی شتابزده و غیراصولی و ساخت سدها از جمله این عوامل می باشند. اخیراً همپوشانی<sup>۲</sup> مناطق حاوی آلودگی VL و ایدز منجر به یک وضعیت اضطراری جدید به نام آلودگی توأم<sup>۳</sup> لیشمانیا / HIV شده است (۱).

در کل اگر چه این بیماری در مقایسه با بعضی بیماری های عفونی از نظر مرگ و میر قابل قیاس نیست ولی دلایلی از جمله طولانی بودن دوره بیماری، احتمال ایجاد عفونت های ثانویه، طول مدت درمان، گاهی عدم پاسخ به درمان و به جا گذاشتن منظره نازیبا، اهمیت کار و مطالعه روی آن را مشخص می کند (۱).

به علت تعدد و تشابه شکلی گونه های این انگل، رده بندی آن به گونه ها و سویه های مختلف از طریق شواهد اپیدمیولوژیک، بالینی و مورفولوژیک ممکن نمی باشد. در سال های اخیر از روش های مولکولی، ایمونولوژیک و بیوشیمیایی جهت این امر استفاده می شود.

امروزه با ابداع روش تکثیر قطعه ای خاص از ژنوم با روش واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR)<sup>۴</sup> استفاده از DNA در شناسایی و تمایز انگل ها بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. با استفاده از PCR می توان از یک کپی DNA طی واکنش های متوالی میلیون ها کپی در مدت زمانی کوتاه ۲ تا ۳ ساعت تهیه کرد (۱).

از بین روش های استفاده شده در تشخیص نوع گونه انگل، روش مقایسه الگوهای ایزوآنزیمی ایزولات های مختلف یکی از دقیق ترین روشهاست. بررسی الگوهای ایزوآنزیمی در واقع بررسی خصوصیات فنوتیپی انگل است که مربوط به آنزیم ها می باشد و کارایی بسیار بالایی در تعیین مشخصات انگل دارد (۱).

---

<sup>1</sup> Anthroponotic

<sup>2</sup> Overlapping

<sup>3</sup> Co-infection

<sup>4</sup> Polymerase Chain Reaction(PCR)



با دسترسی به آنتی بادی های تک دودمانی در اواسط دهه ۱۹۷۰ آنتی بادی های متعددی علیه لیشمانیا تهیه و جهت تشخیص و شناسایی انگل لیشمانیا در دنیای جدید (آمریکای مرکزی و جنوبی) و دنیای قدیم (آسیا، آفریقا، اروپا) مورد استفاده قرار گرفتند (۱).

پادتن های تک دودمانی قادرند سویه های *L. میجر*، *L. دونوانی*، لیشمانیا *برازیلینیس* و *L. تروپیکا* را از یکدیگر تشخیص دهند. بعضی از پادتن ها فقط با مراحل خاصی از چرخه زندگی واکنش می دهند و تعداد دیگری قادرند شاخص های پادتنی را در هر دو مرحله پرماستیگوت و اماستیگوت انگل شناسایی کنند. با استفاده از روش ایمینوفلورسانس غیرمستقیم و الیزا، لیشمانیای تهیه شده از نقاط مختلف جغرافیایی در حضور پادتن های مونوکلونال اختصاصی شناسایی شده و جایگاه و طبقه بندی ژنها مشخص گردیده است. کاربرد این روش از این جهت بسیار زیاد است که روش نسبتاً آسانی می باشد و با تعداد کمی انگل می تواند انجام پذیرد (۱).

## ۱-۲- کلیاتی در مورد لیشمانیوز

### ۱-۲-۱- تعریف لیشمانیوز

لیشمانیوز به گروهی از بیماری های انگلی منتشر در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری گفته می شود که توسط گونه های مختلف تک یاخته ای از جنس لیشمانیا ایجاد می شود و تظاهرات بالینی مختلفی از نوع پوستی، پوستی منتشره و احشایی در انسان و برخی حیوانات ایجاد می نماید و به وسیله انواع مخصوصی از پشه خاکی های ماده از جنس *فلبوتوموس*<sup>۱</sup> انتقال پیدا می کند (۱).

### ۱-۲-۲- تاریخچه

بشر از دیر باز با نوع پوستی لیشمانیوز (سالک) مواجه بوده است و شواهدی مبنی بر شناخت آن در قرون گذشته موجود است (۱).

اولین بار کانینگهام<sup>۲</sup> در سال ۱۸۸۵ در جریان فتح تونس توسط فرانسویان، تک یاخته ها را در ترشحات زخم سربازان فرانسوی مشاهده نمود. در سال ۱۹۰۰ لیشمن<sup>۳</sup> در اتوپسی سربازی که در اثر تب و بزرگی طحال مرده بود، در زیر میکروسکوپ اجسام کوچکی را دید که آن ها را عامل مرگ بیمار دانست (۱).

<sup>۱</sup> . *Phlebotomus*

<sup>۲</sup> . Cunningham

<sup>۳</sup> . Leishman

در سال ۱۹۰۳ دونوان<sup>۱</sup> در اتوپسی بیماران مبتلا به لیشمانیوز احشایی (کالا آزار)<sup>۲</sup> همان ارگانسیم های کوچک را مشاهده کرد و عامل مرگ بیمار دانست. بدین گونه جسم لیشمانیا به عنوان عامل لیشمانیوز جلدی (پوستی) و احشایی شناخته شد. در سال ۱۹۱۱ ونیون<sup>۳</sup> احتمال ناقل بودن فلبوتوم در انتقال لیشمانیا را مطرح نمود. در سال ۱۹۴۱ این نظریه توسط آدلر<sup>۴</sup> و بر<sup>۵</sup> به اثبات رسید. ویانا<sup>۶</sup> در سال ۱۹۱۱ عامل لیشمانیوز پوستی - مخاطی را در قاره جدید لیشمانیا برازیلینیس<sup>۷</sup> معرفی کرد (۲).

### ۱-۲-۳- طبقه بندی انگل لیشمانیا

لیشمانیا یکی از چند جنس موجود در خانواده تریپانوزوماتیده<sup>۸</sup>، رده کیتوپلاستیده<sup>۹</sup>، راسته<sup>۱۱</sup> تریپانوزوماتیده<sup>۱۲</sup> است. این خانواده دارای خصوصیات مشترکی شامل حضور یک کیتوپلاست<sup>۱۳</sup>، یک تاژک<sup>۱۴</sup> در سلول، وجود یک میزبان پستاندار و یک بندپا<sup>۱۵</sup> در سیر تکاملی خود می باشند (۳). جنس لیشمانیا شامل دو زیر جنس مهم به نام لیشمانیا و ویانیا<sup>۱۶</sup> است. زیر جنس لیشمانیا خود شامل پنج کمپلکس مهم از نظر پزشکی و تعدادی دیگر از انگل های غیر بیماری زا برای انسان است (۳). زیر جنس ویانیا شامل دو کمپلکس مهم از نظر پزشکی است که در آمریکای جنوبی و مرکزی (دنیای جدید) حضور دارند.

- 
1. Donovan
  2. Kala azar
  3. Wenyon
  4. Adler
  5. Ber
  6. Vianna
  7. *Leishmania braziliensis*
  8. *Trypanosomatidac*
  9. Class
  10. Kinetoplastidac
  11. Order
  12. *Trypanosomatida*
  13. Kinetoplast
  14. Flagellum
  15. Arthropod
  16. *Viannia*

Kingdom	Protista	(Haeckel,1866)
Subkingdom	Protozoa	(Goldfuss,1817)
Phylum	Sarcomastigophora	(Honigberg & Balamuth,1963)
Subphylum	Mastigophora	(Diesing,1866)
Class	Zoomastigophora	(Calkins,1909)
Order	Kinetoplastida	(Honigberg,1963,Emend.Vickerman,1976)
Suborder	Trypanosomatina	(Kent,1880)
Family	Trypanosomatidae	(Doflein,1901,Emend.Grobben,1905)
Genus	Leishmania	(Ross,1903)

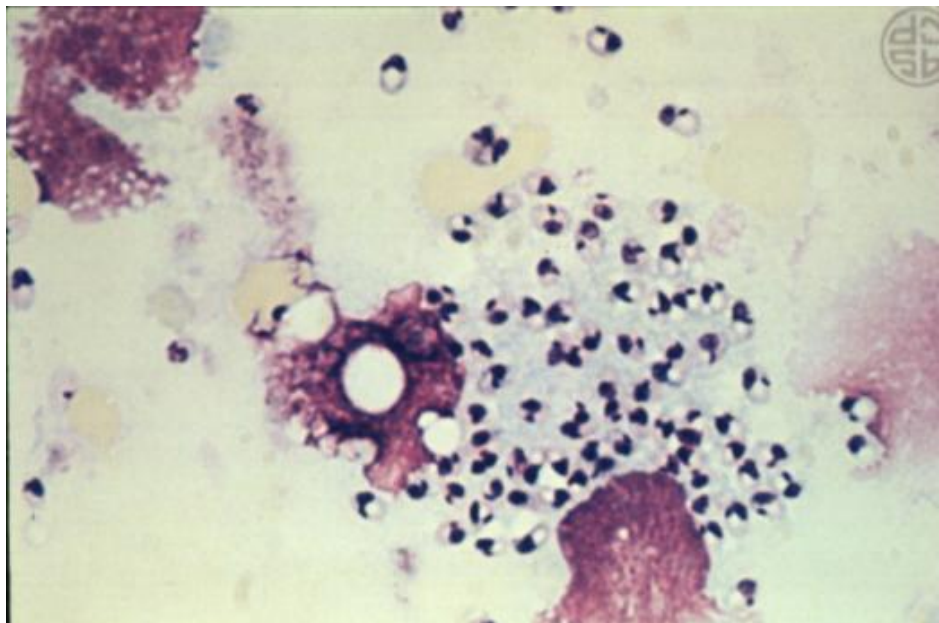
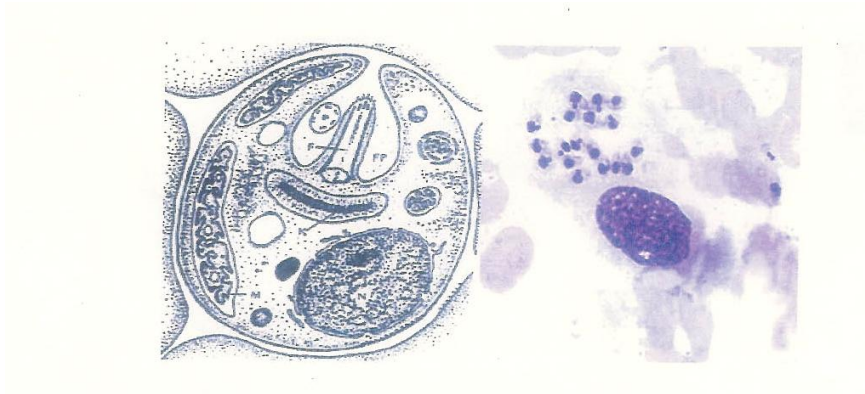
### ۱-۲-۴- مورفولوژی و سیر تکامل لیشمانیا

لیشمانیا در سیر تکامل خود دو میزبان مهره دار و بی مهره دارد. در بدن میزبان بی مهره که در مورد این انگل پشه خاکی از جنس *فلوبوتوس*<sup>۱</sup> یا *لوتزومیا*<sup>۲</sup> است، انگل به شکل تازک دار مشاهده می شود. به این فرم انگل، پروماستیگوت<sup>۳</sup> یا لپتوموناد<sup>۴</sup> گفته می شود و طول آن به ۱۵ تا ۲۵ میکرون و عرض آن به ۲ تا ۴ میکرون می رسد. اندازه تازک نیز بین ۱۵ تا ۴۰ میکرون است. در این حالت تکثیر انگل به صورت تقسیم دو تایی است. جسم کوچک و رنگ پذیری که در سیتوپلاسم انگل مشاهده می شود و تازک از مجاورت آن منشأ می گیرد، کیتوپلاست<sup>۵</sup> نامیده می شود و جنس آن از DNA است. فرم تازک دار انگل، هم در محیط های کشت و هم در دستگاه گوارش پشه خاکی مشاهده می شود (۳). شکل (۱-۱).

شکل بی تازک که اماستیگوت<sup>۶</sup> یا جسم لیشمن<sup>۷</sup> نامیده می شود، در بدن میزبان مهره دار مشاهده می گردد. در این حالت انگل به صورت مدور یا بیضوی است و اندازه طول آن بین ۲ تا ۵ میکرون می باشد. این شکل از انگل در سلول های بیگانه خوار تک هسته ای ( ماکروفاز )<sup>۸</sup> جا دارد و از طریق تقسیم دو تایی تکثیر می شود. شکل (۱-۲) (۳).

---

1. *Phlebotomus*  
2. *Lutzomyia*  
3. Promastigote  
4. Leptomonad  
5. Kinetoplast  
6. Amastigote  
7. Leishman body  
8. Macrophage



شکل ۱-۱: مرحله آماستیگوت (جسم لشمین) انگل لیشمانیا (اقتباس از رفرنس ۴ و ۵)