Archive of SID

تغییرویرولانس توکسوپلاسما گوندیی

دکتر مهرزاد سرایی صحنه سرایی*، دکتر حسین کشاورز**

خلاصه :

مطالعه ویرولانس از موضوعات مهم تحقیقات توکسوپلاسما گوندیی است. در مطالعه حاضر سویه‌های غیرویرولان توکسوپلاسما گوندیی از مغز خروس و گوسفند به روش زیست سنجی در موش جدا شد. متعاقب تلقیح داخل صفاقی کیستهای نسجی به موشهای تحت تزریق سیکلوفسفامید تاکی‌زوئیت‌ها از حفره صفاقی موشها جمع‌آوری و شمارش شد. چهل و شش پاساژ سریال تاکی‌زوئیت‌ها غیر از پاساژهای ۲۶-۲۳ با استفاده از اگزودای صفاقی انجام شد. در ۱۶ پاساژ اول موشها تحت تزریق سیکلوفسفامید بودند. در پاساژهای ۱ ، ۵ ، ۱۲ ،۲۲ و ٤٦ تاکی‌زوئیت‌های جمع‌آوری شده از حفره صفاقی و مدت بقاء موشها پس از تلقیح تاکی زوئیت‌ها مقایسه گردید. همچنین، از این جهات با سویه RH توکسوپلاسما گوندیی مقایسه شد. براساس یافته‌ها، تاکی‌زوئیت‌ها متعاقب پاساژهای سریال تغییر ویرولانس یافتند و از فرم غیر ویرولان به فرم ویرولان تبدیل شدند. تاکی‌زوئیت‌هایی که در پاساژهای اولیه برای موشها کشنده نبودند، پس از پاساژهای سریال برای موشها کشنده شدند. تعداد تاکی‌زوئیت‌های جمع‌آوری شده از حفره صفاقی افزایش یافت و مدت زمان بقاء موشها پس از تلقیح کاهش یافت. حتی تلقیح ۵۰۰ تاکی زوئیت تغییر ویرولانس یافته اثر کشندگی داشت. در مقایسه با سویه RH، تعداد تاکی‌زوئیت‌های جمع‌آوری شده از حفره صفاقی بطور معنی‌دار کمتر بود و مدت‌بقاء موشهای تلقیح شده با سویه تغییر ویرولانس یافته تا حدی طولانی تر از موشهای تلقیح شده با سویهRH بود.

واژه های کلیدی : توکسوپلاسما گوندیی ، تغییر ویرولانس ، سیکلوفسفامید

مقدمه

توکسوپلاسما گوندیی تک یاخته داخل سلولی اجباری مهره داران خونگرم است . سویه های متعددی از آن شناسایی شده است که بر اساس ویرولانس آنها برای موشهای سفید کوچک آزمایشگاهی به سویه های ویرولان و غیر ویرولان تقسیم می‌شوند. سویه‌های ویرولان موشها را در مرحله حاد عفونت می‌کشند، اما سویه‌های غیر ویرولان موشها را در مرحله حاد نمی‌کشند (۱).

سویه‌های توکسوپلاسما گوندیی به روشهای مختلف قابل نگهداری است، از جمله این روشها پاساژ داخل صفاقی تاکی زوئیت‌ها در موشهاست (۲). پاساژهای سریال و سریع تاکی‌زوئیت‌ها سبب بروز تغییراتی در آنها می شود. این تغییرات شامل از دست دادن توانایی تولید اواوسیست (۳)، افزایش سرعت تکثیر تاکی زوئیت‌ها و تغییر ماهیت آنها از غیر ویرولان به ویرولان می‌باشد (٤و۵).

* استادیار پارازیتولوژی ، بخش انگل شناسی و قارچ شناسی ، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی قزوین

** استاد ایمونوپارازیتولوژی ، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی ، دانشکده بهداشت ، دانشگاه علوم پزشکی تهران

دریافت مقاله: ۸۱/۱۰/۱۹ دریافت مقاله اصلاح شده: ۸۱/۸/۲۵ اعلام قبولی: ۸۱/۹/۱۱

www.SID.ir

Archive of SID

در مطالعه حاضر تاکی زوئیت‌های سویه‌های غیر ویرولان در موشها پاساژ سریال داده شدند و متعاقب پاساژها تغییر ویرولانس آنها مورد مطالعه قرارگرفت. تغییر ویرولانس توکسوپلاسما گوندیی به وسیله ژاکوپس و میلتون گزارش گردید(٤). گزارش ما به دو دلیل عمده حائز اهمیت می‌باشد، اولاً، تاکی‌زوئیت‌های جمع‌آوری شده از حفره صفاقی موشها طی پاساژهای مختلف شمارش شد که در موارد مقایسه، نتایج جالب توجه بود. ثانیاً، تعداد تاکی زوئیت‌های جمع‌آوری شده در این مطالعه با مطالعه ژاکوپس و میلتون مقایسه شد که نتایج این مقایسه نیز بسیار ارزشمند به‌نظرمی‌رسد.

مواد و روش کار :

انگل : سویه های غیرویرولان توکسوپلاسما گوندیی از مغز گوسفند و خروس به روش زیست سنجی در موش جدا شد (٦) و سویه RH نیز از بخش تک یاخته شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه شد.

حیوان آزمایشگاهی: در۲۱ پاساژ اول از موشهای BALB/c و در بقیه پاساژها از موشهای سفید کوچک آزمایشگاهی نژاد ناخالص سوری[1] استفاده گردید.

تلقیح، جمع آوری و شمارش تاکی زوئیت‌ها: از مغز موشهای دارای کیستهای نسجی ایزوله‌های گوسفندی و خروسی توکسوپلاسما گوندیی به طور جداگانه و با استفاده از سرم فیزیولوژی حاوی آنتی بیوتیک (۱۰۰۰ واحد پنی سیلین و ۱۰۰ میکروگرم استرپتومایسین به ازای هر میلی لیتر) سوسپانسیون تهیه شد و در هر مورد به ۵ موش و به هر موش حدود یک میلی لیتر به طریق داخل صفاقی تلقیح شد .موشها پنج روز قبل از تلقیح تا زمان پونکسیون صفاقی تحت تزریق سیکلوفسفامید[2] بودند. این دارو هفته‌ای ۲ بار و هر بار به میزان ۲ میلی‌گرم به طریق زیر جلدی در ناحیه شکم به موشها تزریق شد. اگزودای صفاقی در آستانه مرگ موشها پس از بیهوشی کامل با کلروفرم به طریق شستشوی صفاقی با سرم فیزیولوژی استریل جمع آوری شد. بقیه پاساژها غیر از پاساژهای ٢٦ـ ٢٣ با استفاده از اگزودای صفاقی انجام شد. در موارد شمارش تاکی‌زوئیت‌ها، اگزودا با فشار از سرسرنگ نمره ۲۷ عبور داده شد و با هموسیتومتر شمارش گردید. در پاساژهای ۱ ، ۵ و ۱۲ در هر پاساژ به ۲ گروه ده تایی موشها و به هر موش حدود 5×10^5 تاکی زوئیت ایزوله‌های گوسفندی و خروسی به طریق داخل صفاقی تلقیح شد. از پاساژ ١٦ تزریق سیکلوفسفامید به موشها حذف شد. در پاساژ ۲۲ به ۳ گروه ده تایی موشها و به هر موش حدود 10^6 تاکی زوئیت ایزوله‌های گوسفندی، خروسی و سویه RH توکسوپلاسما گوندیی به طریق داخل صفاقی تلقیح شد. مدت زمان بقاء موشها و تعداد تاکی‌زوئیت‌های جمع‌آوری شده از حفره صفاقی طی پاساژهای فوق مورد مقایسه قرار گرفت. در پاساژهای ٢٦-٢٣ خون و مغز موشها به طور جداگانه پاساژ داده شد. برای پاساژ خونی، جدار داخلی سرنگ با هپارین آغشته شد و ۰/۵ میلی لیتر خون قلب موش با ۱/۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل رقیق شد و در هر پاساژ به ٤ موش تلقیح شد. در پاساژ ٤٦ ، مدت زمان بقاء موشها و تعداد تاکی زوئیت‌های جمع‌آوری شده متعاقب‌تلقیح دوزهای مختلف تاکی‌زوئیت‌ها مورد مقایسه قرار گرفت.

آزمون آماری: داده ها با آزمون غیر پارامتری من ویتنی[3] و کروسکال ـ والیس[4] آنالیز گردید.

1- Suris - suris

2- pharmacia & upjohn
3-Mann- whitney
4-Krwschal - Walies

www.SID.ir

Archive of SID

یافته‌ها :

با بکارگیری سیکلوفسفامید تعداد قابل توجهی تاکی زوئیت از سویه های غیر ویرولان توکسوپلاسما گوندیی بدست آمد . میانگین تعداد تاکی زوئیت های جمع آوری شده در پاساژ پنجم به طور معنی داری بیشتر از پاساژ اول بود (P <۰/۰۰۱) (جدول ۱). در پاساژ پنجم، اکثر موشها در روزهای ۸-۷ پس از تلقیح کز کردند. در پاساژ پنجم،همزمان‌به‌تعداد مساوی،تاکی‌زوئیت ایزوله‌های گوسفندی و خروسی به گروههای چهارتایی موشها که تحت تزریق سیکلوفسفامید نبودند،تلقیح شد. تمامی این موشها یک ماه پس از تلقیح زنده بودند و در این زمان کیستهای نسجی توکسوپلاسما با جستجوی میکروسکوپی گسترشهای تهیه شده از مغز موشها اثبات شد.

میانگین تعداد تاکی زوئیت های جمع آوری شده در پاساژ دوازدهم به طور معنی دار بیشتر از پاساژ پنجم بود (P <۰/۰۵) (جدول ۱). همچنین، مدت زمان بقاء موشها کاهش یافت و موشها در روزهای ۵ تا ٦ پس از تلقیح در آستانه مرگ قرار گرفتند. مدت زمان بقاء موشهای تلقیح شده با ایزوله‌های گوسفندی و خروسی اختلاف معنی‌دار نداشت . از پاساژ شانزدهم با وجود حذف تزریق سیکلوفسفامید، موشها در موعد پونکسیون صفاقی کز کردند و تاکی‌زوئیت‌ها در مایع صفاقی آنها اثبات شد پاساژ بیست و دوم ایزوله‌ها با سویه RH مقایسه شد. میانگین بقاء موشهای تلقیح شده با سویه RH به طور معنی دار کوتاهتر و تعداد تاکی زوئیت‌های جمع‌آوری شده از سویه RH به‌طور معنی‌دار بیشتر از ایزوله‌ها بود (P <۰/۰۰۱) (جدول ۱).

متعاقب پاساژ خون و مغز موشهای آلوده شده با تاکی‌زوئیت‌های ایزوله‌ها، تمامی موشها در روزهای ۷ تا ۱۰ تلقیح کز کردند و در اگزودای صفاقی آنها تاکی زوئیت اثبات شد و نتایج کشت باکتریایی اگزودا در محیطهای بلاد آگار، مکونگی آگار و در محیط آبگوشتی تیوگلیکولات منفی بود.

در پاساژ چهل و ششم، میانگین مدت بقاء موشها و تعداد تاکی‌زوئیت‌های جمع آوری شده متعاقب تلقیح دوزهای مختلف تاکی‌زوئیت مقایسه شد (جدول ۲). بر اساس نتایج این تجربه، تلقیح تعداد کم تاکی‌زوئیت‌های ایزوله‌های گوسفندی و خروسی نیز بر موشها اثر کشندگی داشت. در مورد تلقیح تعداد مساوی تاکی زوئیت، میانگین بقاء موشهای تلقیح شده با سویه RH به طور معنی دار کوتاهتر از موشهای تلقیح شده با ایزوله‌ها بود. تفاوت مدت بقاء موشها با حداقل و حداکثر تاکی زوئیت تلقیح شده در مورد سویه RH حداکثر۲روز و برای‌ایزوله‌هاحداکثر۳روز بود.

بحث

در مطالعه حاضر تاکی زوئیت‌های ایزوله‌های غیر ویرولان توکسوپلاسما گوندیی پس از پاساژهای مداوم بر روی موشها به فرم ویرولان تغییر یافت . موافق با گزارشات قبلی (٤ ، ٥) پاساژهای سریال و سریع تاکی زوئیت های غیر ویرولان در *in vivo* سبب تغییر آنها به فرم ویرولان می شود. الگوی پاساژ سریال در مطالعه حاضر و مطالعات قبلی (٤و٥) تا حدی تفاوت دارد. در این مطالعه، موشها در پانزده پاساژ نخست تحت تزریق سیکلوفسفامید بودند و در تمامی پاساژها به استثنای پاساژهای ۲٦-۲۳ از اگزودای صفاقی استفاده شد. در مطالعات قبلی (٤و٥) موشها تحت تزریق سیکلوفسفامید نبودند و پاساژهای ابتدایی با سوسپانسیونی از مخلوط مغز و کبد (٤) و یا سوسپانسیونی از کبد و طحال (٥) انجام گردید، بقیه پاساژها با اگزودای صفاقی انجام شد.

www.SID.ir

Archive of SID

در مطالعه حاضر تا پنجمین پاساژ تغییری در ویرولانس تاکی زوئیت ها مشاهده نشد . به سبب بکارگیری سیکلوفسفامید در ۱٦ پاساژ اول ، مشخص نشد که پس از چند پاساژ تغییر ویرولانس اتفاق افتاد . به نظر می رسد تغییر ویرولانس روند تدریجی دارد و افزایش سرعت تکثیر تاکی زوئیت ها نمودی از آن است . این روند در مطالعه ژاکوپس و میلتون (٤) نیز مشهود است، به طوری که در پاساژ اول اگزودای صفاقی کمی بدست آمد، در پاساژهای ۱۲-۱۰ ، موشها یک هفته پس از تلقیح مردند، در پاساژ شانزدهم مدت بقاء موشها کوتاهتر بود و در پاساژ بیستم اگزودای صفاقی مملو از انگل بود. در مطالعه پترسین (٥) مدت زمان لازم برای تکثیر پس از پاساژهای سریال از ٦/٧ ساعت به ٤/٨ ساعت کاهش یافت. در مطالعه آنها از پاساژ نهم اگزودای صفاقی تشکیل شد و موشها مردند و در پاساژ سیزده سویه تغییر ویرولانس یافته قابل مقایسه با سویه RH در مطالعه کافمن و همکاران (۷) بود. شاید مطالعه فعالیت DNA[1] پلیمراز تاکی‌زوئیت‌ها در پاساژهای سریال روشن کننده روند تدریجی افزایش ویرولانس باشد . فعالیت DNA پلیمراز سویه‌های ویرولان از غیر ویرولان بیشتر است(۸).

در مطالعه حاضر تلقیح تعداد کم تاکی‌زوئیت‌های ایزوله‌های گوسفندی و خروسی توکسوپلاسما گوندیی در پاساژ چهل وششم برای موشها کشنده بود که این یافته دلیل روشنی برای تغییر ویرولانس آنها می‌باشد. مدت بقاء موشهای تلقیح شده با سویه تغییر ویرولانس یافته در مطالعه حاضر قدری طولانی‌تر از موشهای تلقیح شده با سویه RH بود و در مطالعه ژاکوپس و میلتون (٤) برعکس. در مطالعه حاضر باکاهش بیست برابر تاکی زوئیت‌های تلقیح شده، مدت بقاء موشها حداکثر ۱/٥ برابر افزایش داشت، در مطالعه ژاکوپس و میلتون (٤) با کاهش یک میلیون برابر تاکی زوئیت‌های تلقیح شده، مدت بقاء موشها حدود ۲ برابر افزایش یافت و در مطالعه گراس و همکاران (۹) با کاهش یک هزار برابرتاکی زوئیت های تلقیح شده این مدت حدود ۱/۳برابر افزایش نشان داد .

یافته های این مطالعه نشان داد تفاوت بارزی بین سویه RH و ایزوله های تغییر و یرولانس یافته وجود دارد متعاقب تلقیح تعداد مساوی انگل، تعداد تاکی زوئیت جمع آوری شده از حفره صفاقی موشها در موارد تلقیح با سویه RH ، حدود ۳-۲ برابر موارد موشهای تلقیح شده با ایزوله‌های تغییر ویرولانس یافته بود . به نظر می رسد مدت زمان لازم برای تکثیر دوتایی تاکی زوئیت‌ها (اندودیوژنی) در مورد سویه RH کوتاهتر باشد. تفاوت سرعت تکثیر سویه‌های ویرولان پیشتر گزارش گردید (۱۰)، به طوری که مدت زمان لازم برای دو برابر شدن برای سویه‌های RH و Martin حدود ۱۲ ساعت و برای سویه ENT حدود ۸ ساعت بود.

شناسایی فاکتور ویرولانس از موضوعات مهم تحقیقات توکسوپلاسما گوندیی است. به نظر می‌رسد مقایسه سویه غیرویرولان ایزوله اولیه با فرم تغییر ویرولانس یافته آن با بکارگیری روشهای ژنتیکی می تواند برای شناسایی فاکتور ویرولانس این تک یاخته ارزشمند باشد.

1- Deoxyribo Nucleic Acid (DNA)

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- میانگین و انحراف معیار (X±SD) مدت بقاء موشها و تعداد تاکی زوئیت های جمع آوری شده از حفره صفاقی گروههای ده تایی موشها متعاقب تلقیح داخل صفاقی تاکی زوئیت های سویه RH و تاکی زوئیت‌های ایزوله های گوسفندی و خروسی توکسوپلاسما گوندیی در پاساژهای اول ، پنجم ، دوازدهم و بیست و دوم

پاساژ	ایزوله گوسفندی		ایزوله خروسی		سویه RH	
	مدت بقاء موش	تعداد تاکی زوئیت ($\times10^6$)	مدت بقاء موش	تعداد تاکی زوئیت ($\times10^6$)	مدت بقاء موش	تعداد تاکی روئیت ($\times10^6$)
اول (۱)	لحاظ نشد (۳)	۵/۸±۱/۷	لحاظ نشد	۵/۳±۱/۲	انجام نشد(٤)	انجام نشد
پنجم (۱)	لحاظ نشد	۱۷/۵±٤/۵	لحاظ نشد	۱۹/۱±٤/٤	انجام نشد	انجام نشد
دوازدهم (۱)	۵/٤±۰/۵۲(۵)	۲٦/۷±٦/۷	۵/٦±۰/۵۲	۲٤/۵±٦/۱	انجام نشد	انجام نشد
بیست و دوم (۱)	۹٦/٤±۸/۳(٦)	۲۹/۳±۷/٦	۱۰۳/٦±۹/۲	۲٦/٤±٦	۷۷/٦±۳/۷	۱۰۵±۲٦/۱

(۱) در پاساژ های ۱ ،۵ و۱۲ حدود 5×10^5 تاکی زوئیت به هر موش تلقیح شد . (۲) در پاساژ بیست ودوم حدود 10^6 تاکی زوئیت به هر موش تلقیح شد . (۳) مدت بقاء موشها پس از تلقیح مورد مقایسه قرار نگرفت . (٤) سویه RH مورد مقایسه قرار نگرفت . (۵) مدت بقاء موشها برحسب روز می باشد . (٦) مدت بقاء موشها بر حسب ساعت می باشد .

جدول ۲- میانگین و انحراف معیار(X±SD) مدت بقاء موشها و تعداد تاکی زوئیت های جمع آوری شده از حفره صفاقی گروههای ۵ تایی موشها متعاقب تلقیح 10^4 ، 5×10^3 ، $2/5\times10^3$ و 5×10^2 تاکی زوئیت سویه RH و تاکی زوئیت های پاساژ چهل و پنجم ایزوله های گوسفندی و خروسی توکسوپلاسما گوندیی به موشها

تعداد تاکی زوئیت تلقیح شده	سویه RH		ایزوله گوسفندی		ایزوله خروسی	
	مدت بقاء موش (روز)	تعداد تاکی زوئیت ($\times10^6$)	مدت بقاء موش (روز)	تعداد تاکی زوئیت ($\times10^6$)	مدت بقاء موش (روز)	تعداد تاکی زوئیت ($\times10^6$)
10^4	۷/۲±. /٤۵	۹۱/۳±۲۲/۱	۷/٦±. /۵۵	۳۰/٦±۷/٤	۷/۸±. /٤۵	۲۵/٦±۱۰/۵
5×10^3	۷/٤± . /۵۵	۹۹/٤±۲٦	۸±. /۷۱	۳۱/۳±۷/۷	۸/٤±. /۵۵	۲٤/۱±٦/۷
$2/5\times10^3$	۸±. /۷۱	۸۸/۹±۲۲/۵	۸/٦±. /۵۵	۳۱/۸±۱۰	۹/۲±. /٤۵	۲٦/۷±۵/۹
5×10^3	۸/٤±. /۵۵	۹۵±۱۵	۹/٤±. /۵۵	۲۸/۸±۷/۳	۹/٦±. /۵۵	۲٦/۷±٦/۷

www.SID.ir

Archive of SID

منابع:

1. Frenkel JK. Host, strain and treatment variation as factors in the Pathogenesis of toxoplasmosis . Am. J. Trop. Med. Hyg . 1953;2:390 _ 416.
2. Dubey JP ; Beattie CP . Toxoplasmosis of animals and man . Florida : CRC press. 1988 .
3. Frenkel Jk; Dubey JP; Hoff Rl. Loss of stages after continuous passage of Toxoplasma gondii and Besnoitia jellisoni. J. parasitol: 1976 ; 23: 421 – 424.
4. Jacobs L ; Melton ML . Modifications of Toxoplasma gondii by passages in various host . Am.J. Trop . Med . Hyg . 1954 ; 3: 447 – 457 .
5. pettersen Ek. Experimental toxoplasmosis in mice and rabbits. Acta path . microbiol . scand . sect . 1977; 85: 95 – 102 .

٦- سرایی م . کشاورز ح . جداسازی توکسوپلاسما گوندیی از مغز پرندگان و پستانداران و ویرولانس ایزوله‌ها برای موشهای آزمایشگاهی ، مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی قزوین : ۱۳۷۸، شماره ۱۱ ، ص ۳٤- ۲۹ .

7. kaufman HE ; Melton ML ; Remington JS ; Jacobs L . Strain differences of Toxoplasma gondii . J parasitol . 1959 ; 45: 189 – 190 .
8. Makioka A. Ohtomo H. An increased DNA Polymerase activity associated with virulence of Toxoplasma gondii. J parasitol. 1995; 81:1021 – 1022.
9. Gross U ; Muller WA ; Knapp S ; Heesemann J . Identification of a virulence – associated antigen of Toxoplasma gondii by use of a mouse monoclonal antibody. Immun . 1991; 59:9511 – 4516 .
10. Appleford P; Smith JE. Toxplasma gondii : the growth Characteristics of three virulent strains. Acta tropica. 1997; 65:97 – 104.

www.SID.ir