تعیین گونه‌های انگل لیشمانیا توسط پادتنهای تک دودمانی در اصفهان

دکتر سیدحسین حجازی[1] ، پروانه نصری فر[2] ، سودابه جمالی[3] ، دکتر علی‌اکبر جهانگیرنژاد[4] ، دکتر علی خامسی‌پور[5]

۱- استادیار انگل شناسی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان؛ ۲- کارشناس ارشد علوم جانوری؛ ۳- دکترای حرفه‌ای علوم آزمایشگاهی؛ ٤- استادیار بیولوژی، دانشگاه اصفهان؛ ٥- استادیار ایمنی شناسی، مرکز آموزش و پژوهش بیماریهای پوست و جذام، دانشگاه علوم پزشکی تهران

مقدمه : اصفهان یکی از کانونهای مهم لیشمانیوز پوستی در ایران است که بر اساس مطالعات اپیدمیولوژی هر دو نوع سالک شهری و روستایی در آن وجود دارد. کنترل این بیماری در هر منطقه به داشتن اطلاعات هر چه جامعتر در مورد مشخصات دقیق انگل نیازمند است. لذا روشهای مولکولی متفاوتی برای شناسایی گونه‌های لیشمانیا ابداع شده که‌یکی از آنها استفاده از پادتنهای تک دودمانی‌است.

هدف : در این مطالعه از پادتنهای تک دودمانی اختصاصی علیه (T11, T10)L. tropica , (T9,T1)L. major و (D2)L. donovani در تعیین هویت گونه‌های عامل لیشمانیوز پوستی در بیماران اصفهانی استفاده شد.

بیماران و روش‌ها: نمونه‌های گسترش مستقیم از حاشیه زخمهای مشکوک به سالک در ۲۹۸ بیمار در اصفهان برداشت شده ، با روش گیمسا رنگ‌آمیزی و به موازات آن بخشی از نمونه‌های برداشت شده به محیط کشت N.N.N. تلقیح و برای تکثیر سریع و ازدیاد به محیط کشت PRMI-1640 همراه با ۱۰ درصد سرم جنین گوساله به عنوان مکمل انتقال داده شد. سپس پروماستیگوتها شمارش شد و به عنوان آنتی‌ژن جهت انجام تست الایزا مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: در ۱۲۰ نمونه میزان رشد پروماستیگوتهابه اندازه کافی بود که از این ۱۲۰ نمونه مورد بررسی در ۱۰۰ مورد عامل بیماری L.major و در ۸ مورد L.tropica شناسایی شد. ولی در ۱۲ مورد نتایج مشکوک بود یعنی با هر دو یا سه پادتن اختصاصی واکنش نشان داد.

نتیجه‌گیری: شایع‌ترین عامل ایجاد سالک در اصفهان شناسایی شده به روش پادتنهای تک دودمانی ، L.major می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: لیشمانیا، الایزا، پادتن تک دودمانی

www.SID.ir

مقدمه

لیشمانیوز بیماری مشترک بین انسان و حیوان است که عامل آن تک یاخته‌ای انگلی متعلق به جنس Leishmania می‌باشد(۱). این بیماری با حدود ۱/۵ تا ۲ میلیون موارد جدید سالانه و ۳۵۰ میلیون نفر در معرض خطر آلودگی وحدود ۱۲ میلیون نفر بیمار، مشکل بهداشتی بیش از ۸۸کشور جهان می‌باشد(۲). ایران نیز از کشورهای بومی این بیماری است و کانونهای مهم اشکال مختلف بیماری در مناطق مختلف کشور مشاهده می‌شود. شکل احشایی بیماری به صورت تک‌گیر در نقاط مختلف و اشکال همه‌گیر آن در بعضی از استانهای شمال غربی کشور وجود دارد و ضمناً به صورت اندمیک از عشایر استان فارس گزارش شده است(۳). علاوه بر این، کانونهای بسیار

مولف مسئول:دکتر سید حسین حجازی- اصفهان،دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

مهمی از شکل پوستی به صورت هیپراندمیک در استان اصفهان و استانهای دیگر کشور وجود داردکه با توجه به بررسیهای سالهای اخیر این کانونها پیوسته در حال گسترش بوده‌اند. این مسئله در مناطق اندمیک روستایی ایران که دارای سطح بهداشت پایینی می‌باشند، دارای اهمیت بسیار است. این وضعیت لزوم طرح برنامه‌ای مدّون و همه جانبه را برای مبارزه و کنترل بیماری مطرح می‌کند. اولین گام برای دستیابی به این هدف، تعیین مشخصات دقیق عامل این بیماری می‌باشد. شباهت شکلی گونه‌ها و زیرگونه‌های مختلف این انگل، تعیین هویت گونه‌ها را با مشکل جدی روبه رو می‌کند. شواهد اپیدمیولوژی و بالینی نیز در افتراق میان گونه‌ها و سویه‌ها کارساز نیستند. در سالهای اخیر برای حل این مسئله مهم از روشهای مولکولی نظیر پادتنهای تک دودمانی، مقایسه ایزوآنزیم‌ها و کاوشگرهای DNA (DNA Probe)استفاده شده است(٤). لذا در این مطالعه جهت شناسایی گونه Leishmania استفاده از پادتنهای تک دودمانی اختصاصی مربوط به هر گونه با تکنیک الایزا مورد نظر قرار گرفته است.

بیماران و روشها

نمونه‌گیری از حاشیه ضایعات مشکوک به لیشمانیوز پوستی به طریقه خراشیدن با اسکالپل از ۲۹۸ بیمار مشکوک به سالک انجام شد. از هر بیمار نمونه‌ای برای تهیه گسترش مستقیم و نمونه‌ای برای کشت در محیط .N.N.N تغییر یافته [فاز جامد این محیط شامل ۱/٤ گرم agar- (Merk)، ۰/۸ گرم NaCl(Merk)، ۰/۲ گرم Glucose (Merk)، ٤/٥ گرم Brain Heart Infusion (Difco) Agar، ۱۰ میلی لیتر خون هپارینه خرگوش و ۹۰ میلی لیتر آب مقطر، فاز مایع شامل ٥ درصد Brain Heart Infusion Brouth] گرفته شد. محیطهای کشت در شرایط ۲٦ درجه سانتیگراد نگهداری شد و پس از رشد پروماستیگوتها برای تولید انبوه به محیط کشت سلولی PRMI –1640 انتقال یافت. بعد از اینکه انگل در این محیط تکثیر یافت هر ایزوله از پروماستیگوتهادر فاز ایستا (Whole organism) توسط بافر فسفات نمکی شستشو و شمارش گردید. سپس با استفاده از پادتنهای تک دودمانی اختصاصی T1 و T9 برای L.major, T10 و T11 برای L.tropica و D2 برای L.donovani و توسط تکنیک الایزا تعیین گونه شد. در این بررسی از سویه‌های شاهد استاندارد شامل

L.tropica (MHOM/IR/NADIM3),
L.major (MRHO/IR/79/ER) ,
L.donovani (MHOM/IN/80/DD8)

و آنتی ایمونوگلوبولین موشی کونژوگه با پراکسیداز و سوبسترای ارتوفنیلن دیامین استفاده شد و درپایان دانسیته نوری با کمک دستگاه خواننده الایزا در طول موج ٤۹۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. تمامی مراحل تعیین هویت انگل با روش الایزا در آزمایشگاه مرکز آموزش و پژوهش بیماریهای پوست و جذام تهران انجام گردید. همچنین آنتی‌بادیهای مونوکلونال نیز از طریق این مرکز در اختیار محققین قرار داده شد.

یافته‌ها

از ۲۹۸ بیمار دارای ضایعه مشکوک به سالک گسترش مستقیم تهیه شد که در ۲۳٤ مورد از آنها (۷۸/٥ درصد) جسم لیشمن مشاهده گردید و در ٦٤ مورد (۲۱/٥درصد) دیده نشد. از بین ۲۹۸ بیمار فقط در ۲۷۷ مورد کشت انجام گرفت که در ۱۸۳ مورد (٦٦ درصد) انگل در محیط کشت رشد کرد و در ۹٤ مورد (۳٤ درصد) رشد نیافت. از بین ۱۸۳ نمونه کشت مثبت، در ۱۲۰ مورد (٦٥/٥ درصد) پروماستیگوتها تا حد مورد نیاز رشد کرده و با استفاده از پادتنهای تک دودمانی از نظر هویت انگل مورد بررسی قرار گرفت. از این تعداد در ۱۰۰ مورد (۸۳/۳ درصد) الگوی واکنش و جذب نوری حاصل مشابه با سویه استاندارد L.major (MRHO/IR/76/ER)، در ۸ مورد

Archive of SID

Archive of SID

(٦/٧ درصد) مشابه با سویه استاندارد L.tropica (MHOM/IR/NADIM3) و در ١٢ مورد (١٠درصد) نتایج مشکوک بود به این ترتیب که با هر دو پادتن تک دودمانی L.major و L.tropica یا L.tropica و L.donovani یا هر سه پادتن L.tropica , L.donovani و L.major واکنش داده بود. لذا با توجه به این موضوع در ١٠٨ مورد گونه انگل دقیقاً شناسایی گردید به طوری که عامل بیماری در ١٠٠ مورد (٩٢/٦درصد) L.major و در ٨ مورد (٧/٤ درصد) L.tropica تشخیص داده شد.

بحث

در این مطالعه جهت تشخیص لیشمانیوز پوستی از گسترش مستقیم و کشت نمونه‌های بیماران استفاده شد. حساسیت لام مستقیم در کل ٧٨/٥ درصد بدست آمد که نسبت به آنچه در مطالعات Rodriguez و همکاران در سال ١٩٩٤ گزارش شد (٦٠ تا ٦٥ درصد) نتیجه بهتری به شمار می‌رود(٥). حساسیت کشف انگل در گسترش‌های رنگ‌آمیزی شده به عواملی از جمله مرحله ضایعه (فعال یا در حال بهبودی)، آلودگیهای ثانویه، واکنش ایمنی میزبان و نحوه نمونه‌گیری بستگی دارد. حساسیت کشت تشخیصی در این مطالعه ٦٦ درصد بدست آمد که قابل مقایسه با سایر مطالعات از جمله Mathis و Peplazes در سال ١٩٩٥ می‌باشد که حساسیت کشت را ٥٦ تا ٦٧ درصد گزارش کرده‌اند(٦). منتهی برخلاف آنچه که انتظار می‌رفت که از آزمایشهای مستقیم حساس‌تر باشد، نتایج مثبت کمتری را در پی داشت. این امر می‌تواند به این خاطر باشد که بیشتر زخمها غالباً به طور ثانویه با باکتریها یا قارچ‌ها آلوده بودند و عفونت توأم باکتریایی یا قارچی ضایعات می‌تواند روش کشت به منظور تشخیص را مختل نماید. در این مطالعه، پادتنهای تک دودمانی اختصاصی برای سه گونه L.major ، L.tropica ، L.donovani بکار برده شد. استفاده از سویه‌های استاندارد این سه گونه (به عنوان کنترل مثبت) و مجاورت آنها با پادتنهای تک دودمانی به طور متقاطع نشان داد که هریک از پادتنها، تنها با سویه اختصاصی خود پاسخ مثبت می‌دهد و با توجه به اینکه در هیچیک از موارد کنترل منفی و بلانک نیز نتیجه مثبتی بدست نیامد، پاسخهای مثبت حاصل از این مطالعه نتایج واقعی و قابل اطمینان محسوب گردیدند.

از ١٢٠ نمونه مورد مطالعه ١٠٠ مورد (٨٣/٣ درصد) به عنوان L.major ، ٨ مورد (٦/٧ درصد) به عنوان L.tropica و ١٢ مورد (١٠ درصد) مشکوک اعلام گردید. بنابر این L.major گونه غالب جدا شده از بین ١٢٠ بیمار مورد مطالعه در اصفهان بوده است. در مطالعه انجام شده توسط حاتم و همکاران در سال ١٣٧٥ جهت تعیین گونه‌های Leishmania از پادتنهای تک دودمانی اختصاصی و تکنیک الایزا استفاده شد. در این مطالعه نیز سویه غالب در بین ٣٨ بیمار اصفهانی L.major (٩٤/٧ درصد) شناسایی گردید(٧).

از ١٢ مورد مشکوک، در ٢ مورد سویه مجهول با هر دو پادتن اختصاصی L.major و L.donovani واکنش نشان داد. همچنین در ٧ مورد سویه مجهول با هر سه پادتن اختصاصی L.major ، L.tropica و L.donovani پاسخ یکسان و غیرقابل تمایز داد و در ٣ مورد نیز سویه مجهول با هر دو پادتن اختصاصی L.major و L.tropica واکنش داد. این نتیجه در مطالعات سایر محققین در مناطق دیگر کشور نیز مشاهده شده است. از جمله مطالعه معطری و همکاران در سال ١٣٧٧ در استان فارس (٨) و مطالعه اردهالی و همکاران در همین سال در شیراز، کرمان و تهران را می‌توان نام برد(٩). با توجه به اینکه پادتنهای تک دودمانی استفاده شده مورد تأیید سازمان جهانی بهداشت بوده و در تجربیات بدست آمده مشخص گردیده که هر پادتن تنها برای یک گونه اختصاصی است و با گونه‌های دیگر واکنش متقاطع ایجاد نمی‌کند، احتمال دارد هر دو یا

سه شاخص آنتی‌ژنیک خاص پادتنهای تک دودمانی دو یا سه گونه در نتیجه جهش در یک ایزوله حضور داشته باشد. در این صورت شاید بتوان وجود استرینهای جدید یا سویه‌های هیبرید را مطرح کرد(۱۰). از آنجا که تاکنون در رابطه با تعیین هویت انگل لیشمانیا مطالعات اندکی در اصفهان و سایر شهرهای ایران با استفاده از تکنیکهای دقیق مولکولی انجام شده است واکثراً نوع گونه انگل براساس اشکال بالینی بیماری و مخازن موجود برآورد شده است، احتمال اینکه گونه‌های دیگری نیز در این شهر یا شهرهای دیگر ایران وجود داشته باشد دور از ذهن نیست. ولی احتیاج به تحقیقات بیشتری در این زمینه وجود دارد به این ترتیب که سویه‌هایی که چنین پاسخهایی ایجاد کرده‌اند با استفاده از روشهای تکمیلی دیگر مثل تعیین مشخصات ایزوآنزیم‌ها یا آنالیز DNA مجدداً مورد بررسی قرار گیرند. اگر این تکنیک‌ها نیز مؤید بر وجود سویه‌های جدید بود آنگاه اصل بودن فرضیه را می‌توان مسلم دانست.

Archive of SID

قدردانی

بدینوسیله از جناب آقای دکتر فرخ مدبر دبیرخبرگان کمیته لیشمانیوز سازمان بهداشت جهانی که در تهیه آنتی‌بادیهای تک دودمانی ما را یاری فرمودند تشکر می‌گردد.

منابع

1- Beth Koff A, Rosen T. Treatment of cutaneous leishmaniasis. J Am Acad Dermatol 1994;31:693-708.

2- Tropical Disease Research. 12th program report. UNDP/World Bank/WHO special program for research and training in tropical disease (TDR). Geneva: WHO, 1995:135-49.

۳- ندیم ا، جوادیان ع، سیدی رشتی ع. همه‌گیری‌شناسی لیشمانیوزها در ایران. در : اردهالی ص، رضایی ح، ندیم ا (مؤلفین). انگل لیشمانیا و لیشمانیوزها. ۱۳۷۳ : ۱۷۶-۲۰۰.

4- Kreutzer R D, Corredor A, Grimaldi G, Morales A. Characterization of Leishmania colombiensis sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a new parasite infecting humans, animals, and phlebotomine sandflies in Columbia and Panama. Am J Trop Med Hyg 1991;44:662-75.

5- Rodriguez N, Guzman B, Rodas A. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasitology PCR and hybridization. J Clin Microbiol 1994;32:2240-52.

6- Mathis A, Peplazes P. PCR and in vitro cultivation for detection of Leishmania spp. in diagnostic samples from humans and dogs. Clin Microbiol 1995;33:7745-49.

۷- حاتم غ ر. تعیین مشخصات انگل لیشمانیا با روش ایزوآنزیم الکتروفورز. پایان نامه جهت اخذ دکترای تخصصی رشته انگل‌شناسی. ۱۳۷۵: دانشگاه علوم پزشکی شیراز.

۸- معطری ا، اردهالی ص. استفاده از پادتنهای تک دودمانی برای تشخیص نوع لیشمانیای جدا شده از بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی در استان فارس. دهمین کنگره بین‌المللی پزشکی جغرافیایی، ۱۳۷۶: شیراز.

Archive of SID

۹- اردهالی ص، معطری ا، حـاتم غ ر، و همکاران. تعیین مشخصات انگل لیشمانیای جدا شده در ایران با استفاده از آنتی‌بادیهای مونوکلونـال اسـتاندارد. دومیـن کنگـره سراسر بیماریهای انگلی ایران، ۱۳۷٦.

10-Torrico M C, Donker S DE , Arevalo J, et al. In vitro promastigote fitness of putative Leishmania (Viannia) braziliensis/Leishmania (Viannia) peruviana hibrids. Acta Tropica 1999;72:99-110.