مجلهٔ علوم پزشکی مدرس
دورهٔ ۹، شماره ۱: از ۱۹ تا ۲۳
بهار ۱۳۸۵
Archive of SID

تشخیص حضور فعال انگل توکسوپلاسما گوندیی در اندامهای مختلف بدن رت پس از آلودگی تجربی با سویه RH

فرشته زارع[1]، عبدالحسین دلیمی‌اصل[2*]، فاطمه غفاری‌فر[3]

۱- کارشناسی ارشد انگل‌شناسی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- استاد انگل‌شناسی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- استادیار انگل‌شناسی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

هدف: توکسوپلاسما گوندیی تک یاخته‌ای کوکسیدیایی است که در بافتهای مختلف بدن رت آلوده به صورت کیست نسجی یافت می‌شود. هدف از این مطالعه، بررسی حضور فعال انگل در بافتهای مختلف رت آلوده شده با سویه RH از طریق تلقیح به موش بوده است.

مواد و روش کار: در این مطالعه تجربی- مداخله‌ای در مجموع تعداد ۷۵ رت و ۵۰۰ موش سوری استفاده شدند. ابتدا با تزریق طریق داخل صفاقی ٤٠ تا ۵۰ هزار تاکی زوایت همه رت‌ها آلوده شدند. ۱۲ ساعت پس از شروع آلوده‌سازی، نمونه‌برداری آغاز شد و تا ۳ روز هر ٢٤ ساعت و پس از آن هر سه روز یک بار تا ٦٠ روز هر بار تعدادی رت را کشته و اندامهایی از قبیل طحال، کبد، قلب، عضلات مخطط، کلیه و مغز آنها جدا شد و پس از له کردن بافتها به‌همراه سرم فیزیولوژی و آنتی‌بیوتیک به موش سوری تزریق شد.

نتایج: در این بررسی مشخص شد کیست انگل از روز پنجم تا روز شصتم (مدت زمان تحقیق) در مغز و از روز نهم تا شصتم در دو بافت عضله و قلب و از روز پنجم تا دوازدهم در طحال و تا بیست و هفتم در کبد حضور دارد. در بافت کلیه، طی شصت روز هیچ انگلی مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: انگل توکسوپلاسما در اندامهایی مانند طحال و کبد برای مدت کوتاه، ولی در مغز و عضلات برای مدت طولانی می‌تواند حضور یابد. اندامهایی مانند کلیه، محل مناسبی برای استقرار انگل نیستند.

کلید واژگان: توکسوپلاسما گوندیی، رت، اندامهای مختلف.

۱- مقدمه

توکسوپلاسما گوندیی[1] تک یاخته‌ای از خانواده کوکسیدیا[2] است که انگل اجباری درون سلولی انسان و حیوانات می‌باشد. میزبان نهایی آن گربه است و در تعداد بی‌شماری از پستانداران و پرندگان بیماری ایجاد می‌کند. به طور کلی انسان از دو راه اکتسابی و مادرزادی به توکسوپلاسموزیس مبتلا می‌شود. سیر بیماری در بدن انسان شامل دو مرحله حاد و مزمن می‌باشد. عوارض و علایم بیماری عمدتاً در مرحله حاد بروز می‌کند و در پی آن با فعال شدن سیستم ایمنی میزبان تکثیر انگل کنترل و کیستهای نسجی در بافتهای میزبان تشکیل می‌شود[۱].

اگرچه توکسو پلاسموزیس اکتسابی در افراد دارای سیستم ایمنی سالم بیماری خفیف یا بدون علایمی‌را ایجاد می‌کند، ولی در افراد با اختلال سیستم ایمنی عوارض و علایم شدید و حتی

* نشانی مکاتبه: تهران، تقاطع بزرگراه جلال آل احمد و شهید چمران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی. تلفن: ۸۸۰۱۱۰۰۱، دورنگار: ۸۸۰۱۳۰۳۰
E-mail: dalimi4@yahoo.com

1. Toxoplasma gondii
2. Coccidia

www.SID.ir

Archive of SID

مرگ را باعث می‌شود. از طرفی در افرادی که بـه نقـص سیـستم ایمنی دچار می‌شوند ویا داروهای سرکوب کننده پاسخهای ایمنی را مصرف می‌کنند آلودگی مزمن ممکن است مجدداً فعـال شـده عوارض شدید و کشنده‌ای مانند آنسفالیت میوکاردیت و پنومونی ایجـاد نمایـد. تـضعیف سیـستم ایمنـی معمـولاً بـه بـروز عـوارض شدیدتری از توکسوپلاسموزیس به خـصوص در دریافـت کننـدگان پیوند منجر می‌شود. حدود ۳۰ درصد موارد مرگ و میر مبتلایـان بـه ایدز در اثر توکسو پلاسموزیس بوده و یکی از علل مـرگ و میـر در این گونه بیماران آنسفالیت توکسوپلاسمایی گزارش شده است [۱].

آلودگی به این تک‌یاخته از سراسر دنیا گـزارش شـده اسـت. ایـن انگل علاوه بر انـسان تعـداد زیـادی از حیوانـات پـستاندار و همچنـین گونه‌های مختلف پرندگان را آلوده کرده و قادر است در طیف وسـیعی از سلولهای میزبان تکثیر یابد، انگل به سه شکل تاکی زوایت، اوسیـست و کیست نسجی می‌باشد. در مرحله حاد بیماری تاکی زوایت‌هـا هـر ٤ تا ٦ ساعت یکبار در سلول میزبان تکثیر یافته و هنگامی‌کـه سیتوپلاسـم انباشته از تاکی زوایت گردد، پاره می‌شود، سپس انگلهای آزاد شـده بـه سلولهای مجاور حمله می‌کنند این عمل باعث تحریک سیـستم ایمنـی بدن می‌شود در نتیجه فعال شدن سیستم ایمنی بدن، انگل فرار کـرده بـه بافتهای مختلف بدن مهاجرت می‌کند و در آنجا کیـست نـسجی ایجـاد می‌کند [۳،۲]. اگر چه اندامهای مستعد آلودگی به انگـل توکـسوپلاسما شناسایی شده‌اند؛ ولی تاکنون در زمینه زمـان شـروع، حـضور و مـدت زمان حضور انگل در یک اندام خاص مطالعه چندانی صـورت نگرفتـه است. تنها تحقیق صورت گرفته در این زمینه مربوط به مطالعه شـریفیان (۱۳۸۳) بااستفاده از روش مولکـولی اسـت [٤]. سـؤال اصـلی مطالعـه حاضـر ایـن اسـت کـه پـس از آلـودگی تجربـی رت بـا سـویه RH توکسوپلاسما گوندیی[1]، انگل در کدام اندام آنها و تا چه مـدت مـستقر می‌شود. پاسخ این سؤال، ما را در شناخت بهتر چرخهٔ زنـدگی انگـل و سیر حرکت آن در بدن میزبان یاری می‌کند.

۲- مواد و روش‌کار

۲-۱- تولید رت‌ها و سورهای عاری از آلـودگی توکسوپلاسمایی

ابتدا ۷۵ موش صحرایی سفید آزمایـشگاهی (رت) و ۵۰۰ مـوش کوچک سفید آزمایشگاهی (سوری) خالص نشده[2] هم سن و هم جنس در شرایط کنترل شده از نظر غذا و پوشـال اتـوکلاو شـده تکثیر و نگهداری شدند. همه رت‌هـا پـیش از شـروع تحقیـق بـا روش Dye test از لحاظ آلودگی به توکسوپلاسما گوندیی مورد آزمایش قرار گرفتند و همه موارد مثبت از مطالعه حذف شدند.

۲-۲- تهیه و تکثیر تاکی زوایت

سوش استاندارد RH توکسوپلاسما گوندی نگهـداری شـده در گـروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس را بـا پاسـاژ متوالی در حفره صفاقی سوری به تعداد کافی تکثیر داده شد.[۳]

۲-۳- آلوده کردن رت‌ها

پس از جمع‌آوری مقدار کافی انگل، همزمان ۷۵ رت مورد آزمایش ابتدا در گروههای سه تایی تقسیم شده و با تزریق ٤۰ تا ۵۰ هزارتاکی زوایت در حجم یک میلی لیتر به صورت داخل صفاقی آلوده شدند [۳].

۲-٤- نمونه‌برداری از اندامها

نمونه‌برداری ۱۲ ساعت پس از تزریـق انگـل و سـپس تـا ۳ روز هـر ۲٤ ساعت و سپس هر سه روز یک بار تا مدت ٦۰ روز صـورت گرفـت. در هر مرحله از نمونه‌گیری یک گروه سه‌تایی از رت‌ها را کشته و اندامهایی از قبیل طحال، کبد، قلب، عضلات مخطط، کلیه و مغز آنها جداسازی شدند.

۲-۵- تهیه نمونه و تلقیح به موش سوری

پس از کشتن رت‌ها با کلروفرم قفسه سـینه آنهـا را بـازکرده، بـا آنژیوکت سرم فیزیولـوی را از بطـن چـپ وارد آئـورت نمـوده، سپس تمام خون از رگ تخلیه می‌شد. پس از انفوزیون، اندامهای مختلف در پلیت‌های جداگانه جمـع‌آوری و چنـدین بـار باسـرم فیزیولوژی شستشو شدند. سپس با استفاده از تیغه بیـستوری هـر اندام را تکه تکه نموده و درهاون مخصوص کـاملاً لـه و همگـن کردیم. دو بافت عضله مخطط و قلب به دو صورت هـضم شـده در آنزیم پپسین و یا هضم نشده تهیه شـدند. انـدامها پـس از لـه شدن در سرم فیزیولوژی، حل و آنتی‌بیوتیکهای استرپتومایسین و پنی‌سیلین به اندازه ۱۰۰ میلی‌گرم برای هر سانتیمتر مکعب بـه آن اضافه و آماده تزریق شدند. هر اندام به سه موش سوری به میزان ۱/۵ سی‌سی به‌صورت داخل صفاقی تزریق گردید [۳].

۲-٦- بررسی موشهای سوری

در طـول ده روز پـس از شـروع آلـودگی علایـم بیمـاری ماننـد بی‌اشتهایی، لاغری، خواب‌آلودگی، ژولیدگی موها وکز کـردن در موشهای آلوده، ظاهر شد. در طول این مـدت از روز چهـارم بـه

1. Toxoplasma gondii (RH strain)
2. Out breed

www.SID.ir

Archive of SID

بعد، هر روز از همه حیوانات تحت مطالعه، مایع صفاقی برداشت و سپس رسوب حاصله مستقیم در زیر میکروسکوپ بررسی می‌شد. در موارد مشکوک برای اطمینان بیشتر لام را با گیمسا[1] رنگ‌آمیزی کرده، سپس بررسی صورت می‌گرفت[۳].

۳- نتایج

در این مطالعه روند حضور توکسوپلاسما در بافتهای مغز، کلیه، کبد، طحال و عضلات رت در خلال آلودگی تجربی به سویه RH توکسوپلاسماگوندی با روش تشخیصی تلقیح به موش انجام شد، که نتایج آن به شرح زیر است.

در جدول ۱ ، نشانگر حضور (+) یا عدم حضور (–) توکسوپلاسما گوندیی در اعضا و اندامهای مختلف رت بر حسب روز پس از آلوده‌سازی است. طبق این جدول، کیست انگل در بافت مغز از روز ششم آلودگی و در بافت قلب و عضلات از روز نهم ظاهر و تا پایان مدت (۶۰ روز) قابل مشاهده بود. در بافت کبد نیز از روز ششم ظاهر و تا روز ۲۷ قابل مشاهده بود. در بافت طحال از روز ششم تا روز ۱۲ قابل مشاهده بود. در بافت کلیه نیز، هیچ کیستی در طول ۶۰ روز مشاهده نشد.

جدول ۲ نشانگر روند بقای موشهای سوری پس از تلقیح اندام رت‌های آلوده به آنهاست، طبق اطلاعات این جدول از روز ششم آلوده‌سازی، انگل در مغز، کبد و طحال و از روز نهم در عضلات مخطط و قلب رت‌ها حضور داشته، به‌طوری که در اثر تلقیح این اندامها به موش، کلیه موشها در اثر آلودگی به توکسوپلاسما تلف شدند. از روز دوازدهم آلوده‌سازی، انگل از طحال و از روز بیست و هفتم از کبد خارج شد، به‌طوری که پس از مدت مذکور در اثر تلقیح این اندامها به موش، کلیه موشها زنده باقی ماندند؛ ولی حضور انگل در عضلات مخطط و قلب رت‌ها همچنان تا روز شصتم، ادامه داشت.

جدول ۱ حضور (+) یا عدم حضور (–) توکسوپلاسما گوندیی در اعضا و اندامهای مختلف رت بر حسب روز پس از آلوده‌سازی

زمان پس از آلوده‌سازی رت (روز)	حضور (+) یا عدم حضور (–) انگل در					
	مغز	کبد	طحال	عضله	قلب	کلیه
۱	–	–	–	–	–	–
۲	–	–	–	–	–	–
۳	–	–	–	–	–	–
۶	+	+	+	–	–	–
۹	+	+	+	+	+	–
۱۲	+	+	+	+	+	–
۱۵	+	+	–	+	+	–
۱۸	+	+	–	+	+	–
۲۱	+	+	–	+	+	–
۲۴	+	+	–	+	+	–
۲۷	+	+	–	+	+	–
۳۰	+	–	–	+	+	–
۳۳	+	–	–	+	+	–
۳۶	+	–	–	+	+	–
۳۹	+	–	–	+	+	–
۴۲	+	–	–	+	+	–
۴۵	+	–	–	+	+	–
۴۸	+	–	–	+	+	–
۵۱	+	–	–	+	+	–
۵۴	+	–	–	+	+	–
۵۷	+	–	–	+	+	–
۶۰	+	–	–	+	+	–

1. Giemsa stain

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲ روند بقای موشهای سوری پس از تلقیح اندام رت‌های آلوده به توکسوپلاسما گوندیی بر حسب زمان پس از آلوده‌سازی رت‌ها

زمان پس از آلوده‌سازی رت (روز)	درصد زنده ماندن موشهای سوری تا ٦٠ روز پس از تلقیح				
	مغز رت	عضلات و قلب	کبد رت	طحال رت	کلیه رت
١	١٠٠	١٠٠	١٠٠	١٠٠	١٠٠
٣	١٠٠	١٠٠	١٠٠	١٠٠	١٠٠
٦	٠	١٠٠	٠	٠	١٠٠
٩	٠	٠	٠	٠	١٠٠
١٢	٠	٠	٠	١٠٠	١٠٠
١٥	٠	٠	٠	١٠٠	١٠٠
١٨	٠	٠	٠	١٠٠	١٠٠
٢١	٠	٠	٠	١٠٠	١٠٠
٢٤	٠	٠	٠	١٠٠	١٠٠
٢٧	٠	٠	١٠٠	١٠٠	١٠٠
٣٠	٠	٠	١٠٠	١٠٠	١٠٠
٦٠	٠	٠	١٠٠	١٠٠	١٠٠

٤- بحث

برای مطالعه حضور انگل در بافت تاکنون از روشهای مختلفی استفاده شده است. این روشها شامل روش تلقیح بافت آلوده به موش سوری، روشهای کشت سلولی، هیستوپاتولوژی[1]، سرولوژیکی[2] و PCR[3] است. مزایای روش تلقیح بافت به موش سوری، این است که این روش، بسیار حساس، ساده، ارزان، مناسب و فاقد موارد مثبت کاذب می‌باشد. در ضمن در این روش می‌توان انگل زنده و فعال را در بافت تشخیص داد. از معایب این روش، این است که علاوه بر وجود خطر انتقال آلودگی به شخص آزمایش کننده، برای تشخیص آلودگی حداقل به ده روز وقت نیاز است [٥]. در مطالعه حاضر با استفاده از این روش حضور انگل زنده توکسوپلاسما در اندامهای مختلف رت بررسی شد. طبق نتایج به‌دست آمده از این مطالعه انگل توکسوپلاسما می‌تواند در اوایل بیماری در اندامهایی مانند طحال و کبد حضور یابد. چون تلقیح انگل به موش به صورت داخل صفاقی صورت گرفته بود قاعدتاً ابتدا اندامهای همجوار مانند کبد و طحال به انگل آلوده می‌شوند، سپس احتمالاً با فعال شدن سیستم ایمنی میزبان، انگل از طحال خارج شده و به محل دیگری مهاجرت کرده و یا از بین رفته است. از روز پنجم آلوده‌سازی، انگل در کبد ظاهر گردید و تا مدت ٢٧ روز در کبد باقی ماند. در سه بافت مغز، قلب و عضله، انگل تا ٦٠ روز پس از آلودگی (پایان مطالعه) همچنان حضور داشت و ممکن است تا پایان عمر میزبان به حضور خود در این بافتها ادامه دهد. در بافت کلیه، انگلی مشاهده نشد؛ اصولا بافت کلیه بافت مناسبی برای رشد توکسوپلاسما نیست.

روش PCR روشی سریع و حساس برای تشخیص توکسوپلاسما گوندی در آزمایشگاه است. شریفیان (١٣٨٣) مطالعه‌ای در این زمینه با استفاده از روش مولکولی انجام داده است [٤]. نتایج مطالعه شریفیان مؤید نتایج مطالعهٔ حاضر است، بدین معنی که هر دو روش تلقیح انگل به موش و روش مولکولی به‌صورت یکسان حضور فعال انگل در اندامهای مختلف را نشان دادند. از معایب روش مولکولی گران بودن و عدم دسترسی آن در همه آزمایشگاهها‌ست. در این روش انگل زنده و مرده را نمی‌توان از هم تشخیص داد و در تکثیر DNA به نمونه‌های شاهد مثبت و منفی و استفاده از پرایمر[4] مناسب نیاز می‌باشد [٥ ـ ٨].

کشت سلولی روش دیگری برای تشخیص آلودگی بافتی به توکسوپلاسما گوندیی است. حساسیت روش کشت سلولی نسبت به روش تلقیح به موش و PCR کمتر است به طوری که در روش PCR حتی حضور یک انگل را می‌توان نشان داد؛ ولی در کشت سلولی حضور حداقل ده انگل ضروری است[٩،٥].

در روشهای سرولوژیکی معمولاً میزان آنتی‌بادی موجود در سرم یا دیگر مایعات با تکنیک‌های متفاوت اندازه‌گیری می‌شود. به

1. Histopathology
2. Serological
3. Polymerase Chain Reaction
4. Primer

www.SID.ir

Archive of SID

دلیل حساسیت و ویژگی متفاوت روشها، ارزش تشخیصی آنها نیز با یکدیگر متفاوت است. اگر چه انجام روشهای سرولوژیکی نسبت به روشهای دیگر راحت‌تر است؛ ولی مشکل تفسیر جوابهای سرولوژیکی همیشه مطرح بوده است. در ضمن جوابهای سرولوژیکی در مرحله حاد بیماری یا در افراد با نقص سیستم ایمنی نمی‌تواند جوابهای صحیحی به ما بدهد[۱۰] . علاوه بر این روش سرولوژی فقط وجود و یا نبود آلودگی را نشان می‌دهد و از تعیین محل دقیق آلودگی در بدن عاجز است.

روش مطالعه مقاطع بافتی نیز یک روش مناسب برای مشاهده تاکی زوئیت، کیست‌های کاذب و حقیقی به شمار می‌آید. ولی اگر تراکم انگل در بافت کم باشد یا هنوز کیست در بافت تشکیل نشده باشد، جواب منفی کاذب به‌دست می‌آید. علاوه بر این مشخص شده که حساسیت آن از تلقیح انگل به موش و PCR کمتر است [۱۲،۱۱] .

به‌طور کلی روش تلقیح انگل به موش همانند روش PCR در تعیین محل دقیق آلودگی به توکسوپلاسما در بدن دارای کارایی بالایی می‌باشد. طبق نتایج این مطالعه، انگل توکسوپلاسما در اندامهایی مانند طحال و کبد برای مدت کوتاه، ولی در مغز و عضلات مخطط و قلب برای مدت طولانی می‌تواند حضور فعال داشته باشد و اندامهایی مانند کلیه، محل مناسبی برای استقرار انگل به‌حساب نمی‌آید.

۵- منابع

[۱] صائبی، ا. بیماریهای انگلی در ایران، چاپ ششم، تهران. انتشارات حیان، ۱۳۷۷ ، ۱۲۳-۲٤۷

[۲] چین، ج. دستور کار کنترل بیماری‌های واگیردار در انسان، صباغیان،حسین، چاپ اول، تهران، انتشارات پورسینا، ۱۳۸۰ .۷۰۱-٦۹٦

[۳] دوبی، ج. توکسوپلاسموزیس در انسان و حیوانات ترجمه اسماعیل ذوقی. ج ۱، دفتر نشر فرهنگ اسلامی، ۱۳۷۲.

[٤] شریفیان، م. مطالعهٔ سیر حرکت انگل توکسوپلاسما گونده‌ای در رت با روش PCR و RT-PCR. پایان نامه برای دریافت دکترای تخصصی انگل شناسی از دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، ۱۳۸۳.

[5] Da Silva AV and Langoni H. The detection of *Toxoplasma gondii* by comparing cytology, histopathology, bioassay in mice, and the polymerase chain reaction (PCR). Vet Parasitol, 2001; 97: 191-198.

[6] Hohlfeld P, Daffos F, Costa JM, Thulliez P, Forestier F, Vidaud M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase chain reaction test on amniotic fluid. New Eng J Med, 1994; 331: 695-699.

[7] Pelloux H, Dupouy-Camet J, Derouin F, Aboulker JP, Raffi F. A multicenter prospective study for the polymerase chain reaction detection of *Toxoplasma gondii* DNA in blood samples from 186 AIDS patients with suspected toxoplasmic encephalitis. AIDS, 1997; 11: 1888-1890.

[8] Bastien P. Molecular diagnosis of toxoplasmosis. Trans R Soc Trop Med Hygiene, 2002; 96: S205-215.

[9] Derouin F & Garin YJ. Isolation *Toxoplasma gondii* by cellular in HIV infected patients. Presse Med. 1992; 921: 1853-1856 (In French).

[10] Estiban Redondo I, Innes EA. Detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of sheep orally challenged with different doses oocysts. Int J Parasitol, 1998; 28: 1459-1466.

[11] Desmonts G, Daffos F, Forestier F, Capella-Pavlovsky M, Thulliez P, Chartier M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. Lancet, 1985; 500-504.

[12] Pereira-Bueno J, Quintanilla-Gozalo A, Perez-Perez V. Evaluation of ovine aboration associated with *Toxoplasma gondii* in spain by different diagnostic techniques. Vet Parasitol, 2004; 1-10.

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir