

تعیین گونه‌های انگل لیشمانیا توسط پادتنهای تک دودمانی در اصفهان

دکتر سیدحسین حجازی^۱، پروانه نصری فر^۲، سودابه جمالی^۳، دکتر علی اکبر جهانگیرنژاد^۴، دکتر علی خامسی پور^۵

۱- استادیار انگل شناسی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان؛ ۲- کارشناس ارشد علوم جانوری؛ ۳- دکترای حرفه‌ای علوم آزمایشگاهی؛ ۴- استادیار بیولوژی، دانشگاه اصفهان؛ ۵- 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 که یکی از آنها استفاده از پادتنهای تک دودمانی است.

هدف: در این مطالعه از پادتنهای تک دودمانی اختصاصی علیه *L. tropica* (T11, T10) و *L. major* (T9, T1) و *L. donovani* (D2) 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 رنگ آمیزی 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 آنتی ژن جهت انجام تست الایزا مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: در ۱۲۰ نمونه میزان رشد پروماستیگوتها به 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

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 و حدود ۱۲ میلیون نفر بیمار، مشکل بهداشتی بیش از ۸۸ کشور 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 تک گیر در نقاط مختلف و اشکال همه گیر 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

مؤلف 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 دارد که 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 (۴). 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 ۱/۴ گرم agar-agar(Merk)، ۰/۸ گرم NaCl(Merk)، ۰/۲ گرم Glucose (Merk)، ۴/۵ گرم Brain Heart Infusion Agar (Difco)، ۱۰ میلی لیتر خون هپارینه خرگوش و ۹۰ میلی لیتر آب مقطر، فاز مایع شامل ۵ درصد Brain Heart Infusion Brouth] گرفته شد. محیطهای کشت در شرایط ۲۶ 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 پروماستیگوتها در 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 سوپسترای ارتوفیلین دیامین استفاده شد و در پایان دانسیته نوری با کمک دستگاه خواننده الایزا در طول موج ۴۹۲ 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 ۲۳۴ مورد از آنها (۷۸/۵ درصد) جسم لیشمن مشاهده گردید و در ۶۴ مورد (۲۱/۵ درصد) دیده نشد. از بین ۲۹۸ بیمار فقط در ۲۷۷ مورد کشت انجام گرفت که در ۱۸۳ مورد (۶۶ درصد) انگل در محیط کشت رشد کرد و در ۹۴ مورد (۳۴ درصد) رشد نیافت. از بین ۱۸۳ نمونه کشت مثبت، در ۱۲۰ مورد (۶۵/۵ 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

(۶/۷ درصد) مشابه با سویه استاندارد *L. tropica* (MHOM/IR/NADIM3) و در ۱۲ مورد (۱۰ درصد) 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 ۱۰۸ مورد گونه انگل دقیقاً شناسایی گردید به طوری که عامل بیماری در ۱۰۰ مورد (۹۲/۶ درصد) *L. major* و در ۸ مورد (۷/۴ درصد) *L. tropica* تشخیص داده شد.

بحث

در این مطالعه جهت تشخیص لیشمانیوز پوستی از گسترش مستقیم و کشت نمونه‌های بیمارانی استفاده شد. حساسیت لام مستقیم در کل ۷۸/۵ درصد بدست آمد که نسبت به آنچه در مطالعات Rodriguez و همکاران در سال ۱۹۹۴ گزارش شد (۶۰ تا ۶۵ درصد) نتیجه بهتری به شمار می‌رود (۵). حساسیت کشف انگل در گسترش‌های رنگ آمیزی 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 ۶۶ درصد بدست آمد که قابل مقایسه با سایر مطالعات از جمله Mathis و Peplazes در سال ۱۹۹۵ می‌باشد که حساسیت کشت را ۵۶ تا ۶۷ درصد گزارش کرده‌اند (۶). 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 با کتریایی 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 ۱۲۰ نمونه مورد مطالعه ۱۰۰ مورد (۸۳/۳ درصد) به عنوان *L. major* ، ۸ مورد (۶/۷ درصد) به عنوان *L. tropica* و ۱۲ مورد (۱۰ درصد) مشکوک اعلام گردید. بنابر این *L. major* گونه غالب جدا شده از بین ۱۲۰ بیمار مورد مطالعه در اصفهان بوده است. در مطالعه انجام شده توسط حاتم و همکاران در سال ۱۳۷۵ جهت تعیین گونه‌های *Leishmania* از پادتنهای تک دودمانی اختصاصی و تکنیک الایزا استفاده شد. در این مطالعه نیز سویه غالب در بین ۳۸ بیمار اصفهانی *L. major* (۹۴/۷ درصد) شناسایی گردید (۷).

از ۱۲ مورد مشکوک، در ۲ مورد سویه مجهول با هر دو پادتن اختصاصی *L. major* و *L. donovani* واکنش نشان داد. همچنین در ۷ مورد سویه مجهول با هر سه پادتن اختصاصی *L. major* ، *L. tropica* و *L. donovani* پاسخ یکسان و غیرقابل تمایز داد و در ۳ 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 ۱۳۷۷ در استان فارس (۸) و مطالعه اردهالی و همکاران در همین سال در شیراز، کرمان و تهران را می‌توان نام برد (۹). 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 آنتی ژنیک 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 و اکثراً 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.

قدردانی

بدینوسیله از جناب آقای دکتر فرخ مدبر دبیر خبرگان 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: ۲۰۰-۱۷۶.
- 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, Peplazcs 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.

۹- اردمالي ص، معطري ا، حاتم غ ر، و همكاران. تعيين
مشخصات انگل ليشمانياي جدا شده در ايران با استفاده
از آنتي باديهاي مونوكلونال استاندارد. دومين كنفره
سراسر بيماريهاي انگلي ايران، ۱۳۷۶.

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