

بررسی ویرولانسی انگل‌های لیثمانیوزی جدا شده از بیماران مبتلا به لیثمانیوز جلدی در محیط آزمایشگاهی

چکیده:

مقدمه و هدف: لیثمانیوز جلدی از بیماری‌های انگلی است که به وسیله انگل لیثمانیا ایجاد می‌شود. تظاهرات بالینی این بیماری با توجه به گونه انگل مولد بیماری، ویرولانسی انگل و همچنین پاسخهای میزبان متفاوت بوده و از ضایعات پوستی محدود تا پاپولی شکل تا انواع ضایعات ملتهب گسترده و یا ضایعات مزمن لوپوئید متغیر است. این مطالعه با هدف بررسی ویرولانسی انگل‌های جدا شده از بیماران مبتلا به لیثمانیوز جلدی در استان فارس صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی انگل‌های جدا شده از زخم بیماران مبتلا به لیثمانیوز جلدی مراجعه کننده به بخش انگل شناسی دانشکده پزشکی شیراز در سال ۱۳۸۳ در محیط‌های کشت انگل تکثیر گردیدند. از تعداد ۲۰ نمونه تهیه شده ۶ نمونه به کشت انبوه رسیده و جهت بررسی قدرت مهاجمی انگل از رده سلولی ماکروفاژ J۷۷۴ استفاده گردید. ماکروفاژها در محیط آر پی ام آی حاوی سرم جنین گوساله ۱۰ درصد کشت داده شده و سپس با فرم متاسیکلیک انگل به نسبت ۱ به ۱۰ مجاور گردیدند. پس از مدت زمان ۳ روز با شمارش صد ماکروفاژ، درصد آلودگی ماکروفاژها و همچنین میانگین تعداد انگل‌های موجود در هر ماکروفاژ محاسبه گردید. یافته‌های آزمایشگاهی به کمک نرم افزار SPSS و آمار توصیفی تجزیه و تحلیل گردیدند.

یافته‌ها: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ویرولانسی انگل‌های جدا شده از بیماران مختلف در لیثمانیوز جلدی متفاوت می‌باشد به گونه ای که درصد آلودگی ماکروفاژها در ایزوله‌های مختلف از ۱۰ تا ۶۲ درصد متفاوت بوده و میانگین تعداد انگل‌های درون ماکروفاژ از ۸ تا ۲۷ عدد متفاوت بوده است. نتایج این بررسی همچنان مشخص نمود که میان شکل ضایعات و قدرت مهاجم انگل‌ها به ماکروفاژها ارتباط وجود دارد به گونه ای که انگل‌های با ویرولانسی بالا ایجاد فرم‌های حادثری از بیماری با زخم‌های گسترده تر نموده‌اند. بررسی محل سکونت بیماران و قدرت مهاجم ماکروفاژی انگل‌های جدا شده از آنان مشخص نمود که میان این دو فاکتور تفاوت معنی داری وجود نداشته و این بدان معنی است که انگل‌های با ویرولانسی بالا در تمامی مناطق مورد مطالعه پراکنده می‌باشند.

نتیجه گیری: انگل‌های جدا شده از بیماران مبتلا به لیثمانیوز جلدی دارای ویرولانسی متفاوت بوده و این تفاوت می‌تواند علت تنوع ضایعات پوستی در لیثمانیوز جلدی باشد. شناسایی سوش‌های با ویرولانسی زیاد و بررسی تفاوت‌های مولکولی و بیوشیمیایی آنها می‌تواند در جهت استفاده از این سوش‌ها در تهیه واکسن مناسب علیه لیثمانیوز جلدی و همچنین مطالعات مرتبط با دارو درمانی مفید واقع گردد.

واژه‌های کلیدی: لیثمانیوز جلدی، ویرولانسی، ماکروفاژ J ۷۷۴

دکتر بهادر سرکاری *

حسن رضا نژاد **

دکتر غلامرضا حاتم ***

دکتر محمد حسین معتضدیان ****

دکتر علی میرجلیلی ****

* دکترای ایمونولوژی، استادیار و عضو هیئت

علمی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، دانشکده

پزشکی، گروه ایمونولوژی

** کارشناس ارشد انگل شناسی، شیراز،

بیمارستان شهید بهشتی، آزمایشگاه

*** دکترای انگل شناسی، دانشیار و عضو هیئت

علمی دانشگاه علوم پزشکی شیراز،

دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی

**** دکترای ایمونولوژی، استادیار و عضو

هیئت علمی مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی،

حصارک کرج

تاریخ وصول: ۱۳۸۴/۵/۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۴/۶/۱۵

مؤلف مسئول: دکتر بهادر سرکاری

پست الکترونیک: sarkarib@yahoo.com

مقدمه

جهت بررسی ویرولانسی انگل استفاده می شود (۴-۶). با شناسایی گونه هایی از انگل با ویرولانسی بالا می توان در هر منطقه از این گونه ایزوله ها در تهیه واکسن و همچنین بررسیهای دارویی استفاده نمود. این مطالعه با هدف بررسی ویرولانسی انگلهای جدا شده از بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی با روش تهاجم ماکروفاژی در محیط آزمایشگاهی و به کارگیری ماکروفاژهای ۷۷۴ J انجام گردیده است.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی از زخمهای بیماران مشکوک به لیشمانیوز جلدی مراجعه کننده به بخش انگل شناسی دانشکده پزشکی شیراز در سال ۱۳۸۳ نمونه گیری به عمل آمد. برای جدا سازی انگل، نمونه های به دست آمده تحت شرایط استریل به محیط دو فازي ان ان ان^(۴) حاوی پنی سیلین (۲۵۰ واحد بر میلی لیتر) و استریپتومايسين (۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) برای کشت انگل منتقل گردید و پس از مدت سه روز به وسیله میکروسکوپ اینورت^(۵) یا تهیه گسترش مستقیم مورد بررسی قرار گرفتند. در

لیشمانیوز از بیماریهای انگلی است که به وسیله تک یاخته ای از جنس لیشمانیا ایجاد می شود. سه نوع اصلی این بیماری شامل لیشمانیوز جلدی، احشایی و جلدی - مخاطی بوده که در نقاط مختلف جهان دیده می شود. لیشمانیوز جلدی و احشایی به صورت آندمیک در قسمتهای مختلف ایران دیده می شود (۱). سالانه ۱-۱/۵ میلیون نفر به لیشمانیوز جلدی مبتلا می شوند که از این تعداد ۹۰ درصد موارد در کشورهای افغانستان، الجزایر، برزیل، ایران، عربستان سعودی، پرو و سوریه اتفاق می افتد (۲). استانهای فارس، اصفهان، خوزستان، یزد و خراسان از کانونهای مهم لیشمانیوز جلدی محسوب می شوند (۱). عامل مولد لیشمانیوز جلدی در ایران لیشمانیای ماژور^(۱) که مولد فرم روستایی یا مرطوب بیماری و لیشمانیای تروپیکا^(۲) که مولد فرم خشک یا شهری بیماری می باشد (۳). علایم بالینی لیشمانیوز جلدی بسته به گونه و سوش ایجاد کننده انگل متفاوت بوده که از یک زخم کوچک پاپولی فاقد ترشحات تا فرمهای با زخمهای وسیع، باد سرخی و فرمهای مزمن لوپوئید یا توبرکلوئید متغیر می باشد. تفاوت در فرم ضایعات ناشی از تفاوت در گونه انگل، ویرولانسی متفاوت آنها و پاسخهای میزبان در مقابل انگل می باشد (۱).

بررسی قدرت تهاجمی انگل به ماکروفاژ در محیط آزمایشگاهی^(۳) از روشهایی است که از آن

1-Leishmania major
2-Leishmania tropica
3-In vitro
4-NNN
5-Invert

دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند تا شرایط لازم جهت تبدیل پروماستیگوت‌های انگل به فاز متاسیکلیک مهیا گردد. پس از گذشت این مدت انگل‌ها به فرم متاسیکلیک تبدیل شده و قادر به آلوده کردن ماکروفاژ خواهند بود. ماکروفاژهای کشت داده شده شمارش شده و غلظت 5×10^6 از آنها تهیه گردید. انگل‌های کشت داده شده نیز شمارش و سپس به ازای هر ماکروفاژ ۱۰ انگل به محیط کشت ماکروفاژها اضافه گردید. محیط کشت حاوی انگل و ماکروفاژ به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۲ درجه (حاوی دی اکسید کربن ۵ درصد) نگهداری سپس محیط روی محیط کشت تخلیه شده و سه مرتبه به وسیله آر پی ام آی به آرامی شستشو داده شدند (ماکروفاژها به ته فلاسک چسبیده اند و در اثر شستشو جدا نمی شوند) تا پروماستیگوت‌های آزاد از محیط خارج شوند. سپس مقدار ۵ میلی لیتر محیط کشت جدید به فلاسکها اضافه شده و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۲ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. پس از این مدت مایع درون فلاسکها تخلیه شده و جهت بررسی درصد آلودگی ماکروفاژها از آنها لام تهیه گردید و پس از رنگ آمیزی با روش گیمسا مورد مطالعه قرار گرفتند. با شمارش صد ماکروفاژ درصد ماکروفاژهای آلوده و همچنین میانگین تعداد

صورت مثبت بودن کشت رشد انگل، نگهداری آنها در محیط دو فاز تا زمانی که تعداد انگل به حدود ۲ میلیون در میلی لیتر برسد ادامه یافته و سپس جهت کشت انبوه به محیط آر پی ام آی^(۱) حاوی ۱۵-۱۰ درصد سرم جنین گوساله^(۲) منتقل گردیدند. محیط‌های کشت در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد جهت رشد انگل تا میزان مورد نیاز نگهداری شدند.

از تعداد ۲۰ نمونه تهیه شده از بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی که با روش مستقیم مثبت گزارش شدند ۶ نمونه به کشت انبوه رسیده و جهت آلوده کردن ماکروفاژها مورد استفاده قرار گرفتند.

در این مطالعه از رده سلول J۷۷۴، ماکروفاژ موشی جهت بررسی قدرت تهاجم انگل لیشمانیا استفاده شده است. این سلولها از انستیتو رازی کرج (اهدایی دانشکده طب گرمسیری لیورپول) تهیه و در محیط آر پی ام آی حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گوساله، ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر استرپتومایسین و ۱۰۰ واحد بر میلی لیتر پنی سیلین و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد حاوی ۵ درصد دی اکسید کربن تحت شرایط استریل کشت داده شدند.

برای آلوده کردن ماکروفاژها به وسیله انگل لیشمانیا، فرم متاسیکلیک انتخاب شد. جهت تهیه این فرم از انگل، درب فلاسکهای کشت حاوی انگل به وسیله پارافیلیم محکم بسته شده و به مدت ۲ روز در

1-RPMI

2-Fetal Calf Serum (FCS)

انگلهای موجود در هر ماکروفاژ مشخص گردید. یافته های آزمایشگاهی به کمک نرم افزار SPSS^(۱) و آمار توصیفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته ها

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که قدرت تهاجم انگلهای مختلف جدا شده از بیماران متفاوت می باشد. نمونه شماره ۱ سبب آلودگی ۵۹ درصد ماکروفاژها شده و میانگین تعداد انگل در ماکروفاژ ۶/۲۲ بوده و بیشترین تعداد انگل ۱۸ انگل در یک ماکروفاژ بوده است. در نمونه شماره ۲، درصد آلودگی ماکروفاژها ۱۰ درصد و میانگین آلودگی ۳/۲ بوده است. نمونه شماره ۳، ۴۰ درصد ماکروفاژها را آلوده کرده که میانگین آلودگی ۲/۷۵ بوده است. نمونه شماره ۴ سبب آلودگی ۶۳ درصد ماکروفاژها شده و میانگین حضور انگل در ماکروفاژها ۴/۲ بوده است. نمونه شماره ۵، ۶۶ درصد ماکروفاژها را آلوده کرده و میانگین حضور انگل ۴/۱۵ بوده است. در نمونه شماره ۶، ۴۰ درصد ماکروفاژها آلوده شده و میانگین

حضور انگل درون ماکروفاژها ۶/۲۷ بوده است. بیشترین تعداد انگل ۲۷ انگل در یک ماکروفاژ بوده است. جدول ۱ نتایج حاصل از آلوده کردن ماکروفاژها به وسیله انگل لیثمانیا در محیط آزمایشگاهی را نشان می دهد.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که میان شکل ضایعات و قدرت تهاجم انگلهای ماکروفاژها ارتباط وجود دارد، به گونه ای که انگلهای با ویروانس بالاتر قادر به ایجاد ضایعاتی با ظاهری ملتهب و شکل باد سرخی می باشند. جدول ۲ ارتباط بین شکل ضایعه و شدت تهاجم انگلهای ماکروفاژ را نشان می دهد. بررسی میزان آلودگی ماکروفاژها (قدرت تهاجم انگل) و محل سکونت افراد نشان می دهد که انگلهای با ویروانس زیاد در مناطق مختلف استان مورد مطالعه (فارس) وجود دارد و مختص یک منطقه خاص نمی باشد. جدول ۳ درصد آلودگی ماکروفاژها به وسیله انگل را با توجه به محل سکونت افرادی که انگل از آنها جدا شده است نشان می دهد.

جدول ۱: نتایج حاصل از آلوده کردن ماکروفاژ موشی ۷۷۴J، به وسیله انگل لیثمانیا در محیط آزمایشگاهی

شماره نمونه	درصد ماکروفاژهای آلوده	بیشترین تعداد انگل درون ماکروفاژ	میانگین تعداد انگل درون ماکروفاژ
۱	۵۹	۱۸	۶/۲۲
۲	۱۰	۸	۳/۲
۳	۴۰	۸	۲/۷۵
۴	۶۳	۱۴	۴/۲
۵	۶۶	۲۰	۴/۱۵
۶	۴۰	۲۷	۶/۲۷

جدول ۲: ارتباط بین شکل ضایعات پوستی بیماران و شدت تهاجم ماکروفاژی انگل لیثمانیا

درصد آلودگی ماکروفاژها	حداکثر حضور انگل در یک ماکروفاژ	شکل ضایعه
۵۹	۱۸	باد سرخی
۶۳	۱۴	باد سرخی
۴۰	۸	پاپول
۱۰	۸	مرطوب
۶۰	۲۰	مرطوب
۴۰	۲۷	مرطوب

جدول ۳: ارتباط میان میزان آلودگی ماکروفاژها به انگل لیثمانیا با محل سکونت بیماران

درصد آلودگی ماکروفاژها	محل سکونت
۵۹	کوار- اکبرآباد
۶۳	شیراز
۴۰	تیون
۱۰	چهرم - قطب آباد
۶۰	خرامه
۴۰	نی ریز

بحث و نتیجه گیری

لیثمانیوز جلدی در افراد آلوده دارای تظاهرات بالینی متفاوتی می باشد. شکل ضایعات در این بیماری می تواند به صورت پاپولی، زخمهای وسیع ملتهب و بادسرخی، زخمهای خشک و در بعضی موارد زخمهای مزمن توپرکلوئید باشد. این تنوع ضایعات و علائم بالینی ناشی از تفاوت در گونه انگل، ویرولاس انگل و پاسخ میزبان به انگل می باشد. انگل‌های با ویرولاس زیاد قادرند سلول‌های بیشتری از میزبان را آلوده نموده و با قدرت تکثیر زیاد در سلول‌ها باعث انهدام تعداد زیادی از سلول‌های میزبان، گسترش ضایعه و ایجاد زخمهای وسیع نمایند. شناسایی گونه های بیماری زای انگل می تواند

در جهت شناسایی آنتی ژنهای بارز آنها جهت تهیه واکسن و همچنین مطالعات دارو درمانی مورد استفاده قرار گیرد (۸ و ۷). استفاده از سلول‌های ماکروفاژی ۷۷۴ J در مطالعات مختلف جهت بررسی قدرت آلوده کنندگی انگل و همچنین مطالعات مرتبط با بررسی دارویی مورد استفاده قرار گرفته است (۹ و ۱). در مطالعه میر جلیلی و سرکاری (۲۰۰۵) از این رده سلولی جهت جداسازی سوش‌هایی از انگل با قدرت تهاجم زیاد استفاده شده است (۱۰). در مطالعه حاضر نیز از این رده سلولی جهت بررسی و مقایسه قدرت تهاجم انگل‌های مختلف جدا شده از بیماران مبتلا به لیثمانیوز جلدی استفاده شده است. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه ویرولاس انگل‌های مختلف

نوبه خود می تواند در تهیه واکسن مؤثر علیه این بیماری مورد استفاده قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

از زحمات کارشناسان محترم بخش انگل شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز به خصوص پروانه حبیبی و سکینه کاظمیان تشکر می گردد .

جدا شده از بیماران مورد مطالعه متفاوت می باشد به گونه ای که قدرت آلوده کنندگی انگلها از ۱۰ تا ۶۳ درصد متغیر بوده است. از طرفی میان درصد آلودگی ماکروفاژی با میانگین حضور انگل در یک ماکروفاژ رابطه معنی داری وجود دارد به گونه ای که در مواردی که میانگین انگل درون ماکروفاژ بیشتر بوده درصد آلودگی ماکروفاژها نیز بیشتر بوده است. این یافته می تواند بیان کننده این باشد که افزایش سرعت تکثیر انگلها در ماکروفاژ سبب انهدام سریع آنها شده و در نتیجه سبب افزایش میزان آلودگی سایر ماکروفاژها شده است. نتایج حاصل از این مطالعه مشخص نمود که شکل ضایعه با میزان تهاجم انگل در محیط آزمایشگاهی مرتبط است و ضایعات منتشر عموماً در اثر ایزوله هایی ایجاد شده اند که دارای قدرت تهاجم بیشتری بوده اند هر چند عوامل میزبان نیز در این رابطه نقش خاص خود را دارند. بررسی قدرت تهاجم ماکروفاژی انگلهای جدا شده از بیماران از مناطق مختلف نشان دهنده این مطلب است که میان این عامل مورد مطالعه و محل سکونت رابطه معنی داری نیست و این بدان معناست که انگلهای با قدرت آلوده کنندگی زیاد مختص یک منطقه خاص نبوده و در سطح منطقه مورد مطالعه پراکنده می باشند.

بررسی مولکولی و بیوشیمیایی انگلهای با ویروالانس زیاد می تواند باعث شناسایی آنتی ژنهای مؤثر در این زمینه (۱۱) و همچنین شناسایی شاخص آنتی ژنیک مرتبط با این ویروالانس شود که این امر به

An in Vitro Study on Virulence of Leishmania Parasite Isolated from Cutaneous Leishmaniasis Patients

Sarkari B^{*},
Rezanejad H^{**},
Hatam GHR^{***},
Motazedian MH^{****},
Mirjalili A^{*****}

^{*} Assistant Professor of Immunology, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

^{**} MSc in Parasitology, Shahid Beheshti Hospital, Shiraz, Iran

^{***} Associate Professor of Parasitology, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

^{****} Assistant Professor of Immunology, Biotechnology Department, Razi Vaccine and Serum Research Institute (RVSRI), Hesarak, Karaj, Iran

KEYWORDS:

Cutaneous leishmaniasis,
Virulence,
J774 macrophage

Received: 2/5/1384

Accepted: 15/6/1384

Corresponding author: Sarkari B
E mail:sarkarib@yahoo.com

ABSTRACT:

Introduction & Objective: Cutaneous Leishmaniasis (CL) is a parasitic disease caused by Leishmania parasites. Clinical manifestation of this disease ranges from a small papule to disseminated cutaneous lesion or chronic tuberculoid ulcer and is based on the type and virulence of parasite and also immune responses of the host. This study aimed to determine the virulence of Leishmania parasite isolated from cutaneous leishmaniasis patients.

Materials & Methods: Isolated parasites from CL patients were cultured. Macrophage cell line (J774) cultured in RPMI medium was used in this study to find out the virulence of isolated parasite. Cell line was infected by metacyclic form of parasite where parasite was added to the macrophage culture on a ratio of 10/1. Three days later, cell lines were checked for any infection and the rate of macrophage infectivity and mean of parasite number in each macrophage were calculated.

Results: Results of this study showed that virulence of isolated parasite was different where the rate of macrophage infection was 10-63%. Results also revealed that there was a correlation between the rate of macrophage infection and type of ulcers, where more invasive isolates induced ulcerative sores. No correlation was found between the rate of macrophage infection and place of resident of CL patients.

Conclusion: Isolated parasites from CL patients had different virulence and this might be the reason for various clinical signs in CL. Molecular and biochemical characterization of the most virulent isolates can be useful for vaccine development and also for drug related studies.

