مجله دانشکده پزشکی
دانشگاه علوم پزشکی تهران
سال ۶۲، شماره ۵، صفحات ۳۵۷ تا ۳۶۲، (۱۳۸۳)

بررسی هویت گونه‌های انگل لیشمانیا در اشکال بالینی غیر معمول لیشمانیوز جلدی با استفاده از آنتی بادیهای منوکلونال

دکتر گیتی صادقیان*، دکتر سیدحسین حجازی**، دکتر محمدعلی نیلفروش‌زاده*
* مرکز تحقیقات بیماری‌های پوستی و سالک، بیمارستان امین، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
** گروه انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

مقدمه: لیشمانیوز جلدی بیماری انگلی است که توسط گونه‌های مختلف انگل لیشمانیا ایجاد می‌شود. در بعضی مواقع با مواردی از بیماری مواجه می‌شویم که هم از نظر شکل بالینی و هم دوره و سیر با حالات معمول تفاوت دارند. هدف از انجام این مطالعه تعیین هویت انگل لیشمانیا در این موارد بوده است.

مواد و روشها: این مطالعه از نوع توصیفی و روش‌نمونه‌گیری آسان بود. از بیماران مراجعه کننده با اشکال بالینی غیر معمول اسمیر مستقیم تهیه و بخشی از نمونه برداشت شده وارد محیط کشت NNN گردیده و پس از آن جهت تولید انبوه به محیط کشت RPMI۱۶۴۰ انتقال یافته، پروماستیگولتهای بدست آمده در پلیت الایزا پوشش داده شد و با استفاده از منوکلونال آنتی بادی اختصاصی ایزوله‌ها تعیین هویت گردید.

یافته‌ها: از ۷٤ نمونه مورد بررسی ٪۸۷/۸ L.major و ٪۱۲/۲ L.tropica گزارش گردید. اشکال غیر معمول که تحت انجام آزمایش قرار گرفتند شامل ضایعات اقماری در ٪٤۰/٥٤ اسپوروتریکوئید ٪۳۳/۷۸ ، ضایعات مزمن (بیش از ۲ سال) ٪۹/٤٥، زوستریفرم ٪٦/۷٥ ، وروکوز ٪٥/٤ و اریزیلوئید ٪٤/۰٥ بودند تعداد ٥۰ نفر (٪٦۷/٥٦) از بیماران هیچ درمانی قبل از بروز ضایعات آتیپیک دریافت نکرده و ۲٤ نفر (٪۳۲/٤۳) تحت درمانهای مختلف قرار گرفته بودند. از ۷٤ بیمار ۳٦ نفر از شهر اصفهان بودند که در آنها ٪۲٥ L. tropica و ٪۷٥ L.major جدا گردید و از کل ۳۸ نفر مراجعه کننده از حومه L.major جدا شد.

نتیجه گیری و توصیه ها: گونه‌های جدا شده در این مطالعه شامل L.major و L.tropica بودند و رابطه معنی‌داری بین اشکال بالینی غیر معمول و گونه‌های جدا شده وجود نداشت. بیشترین اشکال غیر معمول روی اندام مشاهده گردیدند. رابطه معنی داری نیز بین درمانهای انجام شده قبلی و یاعدم درمان و اشکال بالینی آتیپیک بیماری وجود نداشت از افراد مراجعه کننده داخل شهر هر دو گونه ولی از حومه فقط گونهٔ L.major جدا گردید.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-31]

مقدمه

لیشمانیوز جلدی بیماری انگلی است که در بعضی کشورهای جهان از جمله ایران بطور آندمیک وجود دارد. بیش از ۱۲ میلیون نفر در جهان به این بیماری آلوده‌اند و شیوع موارد جدید ۴۰۰۰۰۰ در سال می‌باشد. گسترش این بیماری در تمام قاره‌های جهان به جز استرالیا می‌باشد (۱). بیماری عمدتاً توسط چهار تیپ L.aethiopica , L.infantum, L.tropica, L.major ایجاد می‌شود (۲).

بیماری که در اثر L. major ایجاد می‌شود معمولاً به صورت یک پاپول یاندول که اغلب بدون درد و خارش است شروع و بتدریج بزرگ می‌شود و بعد از آن دلمه مرکزی روی آن تشکیل شده که ممکن است دلمه بیفتد و زخم زیرین آشکار شود که بعد از مدت ٦ ماه التیام و نهایتاً جوشگاه بجا می‌گذارد. در لیشمانیوز جلدی ناشی از L. tropica بیماری با ندول قهوه‌ای رنگ که به آرامی وسیع می‌شود شروع شده و بعداً تشکیل پلاکی به قطر ۱ تا ۲ سانتی‌متر داده و زخم کم عمقی ایجاد می‌شود که بعد از ۸ تا ۱۲ ماه بهبود و جوشگاه بجا می‌گذارد. به هر حال در بسیاری موارد از روی تظاهرات بالینی نمی توان لیشمانیوز جلدی ناشی از L.major و L.tropica را از یکدیگر بازشناخت (۳ و ٤). لیشمانیوز ناشی از L. aethiopica ضایعه در وسط صورت و منفرد می‌باشد که زخمی می‌شود و ظرف مدت ۲ تا ۵ سال بهبود می‌یابد. لیشمانیوز جلدی ناشی از L. infantum در بالغین ضایعه جلدی منفرد خود بخود بهبود یابنده‌ای ایجاد می‌کند که سیری معمولی دارد ولی در شیرخواران ایجاد لیشمانیوز احشایی می‌کند (۲). علاوه بر موارد فوق با اشکال بالینی غیر معمول بیماری مواجه می‌شویم از جمله فرم راجعه یا رسیدیوانس که در آن بعد از بهبود ضایعه اولیه فعالیت مجدد بیماری وجود دارد و عامل آن را واکنش غیر طبیعی سیستم ایمنی میزبان ذکر می‌کنند (۲). اخیراً گفته شده که در ۵۰٪ این موارد عفونت مجدد با گونهٔ دیگری از لیشمانیا وجود دارد (۱). در رفرانس دیگری عامل این شکل بالینی L. tropica ذکر گردیده است (۵). در لیشمانیوز جلدی منتشر با عامل L. aethiopica یک ضایعه اولیه وجود دارد که بصورت لوکال منتشر میشود و از این نقطه بیماری به سایر قسمتهای پوست منتشر می‌گردد. مناطق وسیعی از بدن را در گیر می‌کند (۲). در اشکال بالینی زونایی یا زوستریفرم و در مواردیکه ضایعات اقماری ایجاد می‌شوند، معمولاً سیر بیماری پیشرونده می باشد. شکل کلینیکی بادسرخی که بیشتر اوقات روی گونهٔ خانم‌های مسن وقوع می‌یابد که شیوع جوشگاه در این مورد کمتر می‌باشد (٦). در فرم‌های اسپوروتریکوئید انتشار ضایعه در مسیر لنفاتیک وجود دارد. از اشکال بالینی دیگر نوع کلوئیدال و زگیلی می‌باشند که در اندام تحتانی گزارش شده‌اند (۲) و نوع پسوریازیفرم نیز وجود دارد که مناطق وسیعی از بدن را درگیر می‌کند (۲).

تا کنون مطالعه‌ای در مورد تعیین هویت انگل در موارد بالینی غیر معمول انجام نشده است. بهرحال در مطالعه‌ای که در اصفهان انجام شده و گونه‌های انگل لیشمانیا توسط پادتن‌های تک دودمانی تعیین گردیده است در ۸۳/۳٪ L.major و در ٦/۷٪ L. tropica و در ۱۰٪ نتایج مشکوک گزارش گردیده است (۷). همچنین در مطالعهٔ دیگری که مشخصات انگل لیشمانیا با روش ایزوآنزیم الکتروفورز تعیین گردیده است علاوه بر لیشمانیا ماژور و لیشمانیا تروپیکا لیشمانیا اینفانتوم به عنوان عامل لیشمانیوز جلدی در ۲ مورد و برای اولین بار از ایران گزارش گردیده است و نیز مشخص شده که L. tropica عامل لیشمانیوز جلدی راجعه در بیشتر موارد بوده است (۹،۸).

در مطالعه بعدی ارگانیسم‌های جدا شده از کانونهای شناخته شده و جدید لیشمانیوز جلدی در ایران (شیراز، تهران، کرمان) با استفاده از آنتی‌بادیهای منوکلونال گونه‌های لیشمانیا تروپیکا، لیشمانیا ماژور و لیشمانیا اینفانتوم جدا گردیدند (۱۰).

در مطالعه دیگری که توسط PCR با آنتی بادیهای منوکلونال روی نمونه‌های جمع‌آوری شده از هفت ناحیه مختلف آندمیک ایران انجام شده است از ۷۷ نمونه ایزوله شده در ٤۲ مورد لیشمانیا ماژور و ۲۲ مورد لیشمانیا تروپیکا و ۵ مورد Crithidia luciliae جدا گردید، و در

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-31]

نمونه‌های جدا شده از اصفهان ١٥ مورد لیشمانیا تروپیکا و ٥ مورد لیشمانیا ماژور گزارش گردیده است (١١).

از مطالعات دیگر که در ایران انجام گرفته است استفاده از PCR در بیماران با لوپونید لیشمانیوز بوده است که توانسته‌اند در ٣٠ نفر از ٦٣ بیمار با این روش انگل را جدا کنند ولی گونه‌های آن گزارش نگردیده است (١٢). با توجه به مطالب فوق و نامشخص بودن گونه های عامل در ضایعات غیر معمول کلینیکی سالک به نظر رسید که تعیین هویت انگل در اشکال آتیپیک بیماری امری ضروری می‌باشد تا با توجه به آن بتوان اقدام پیشگیری کنندهٔ لازم و تدبیرات درمانی مؤثری را برای این بیماران اتخاذ نمود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع توصیفی و روش نمونه گیری آسان بود. بیماران از افراد مبتلا به لیشمانیوز جلدی با اشکال بالینی غیر معمول توسط پزشک متخصص پوست انتخاب گردیدند. این بیماران از گروههای سنی مختلف و از هر دو جنس بوده‌اند. پس از انتخاب برای آنها پرونده تشکیل گردید که در آن سن، جنس، طول مدت بیماری، شکل کلینیکی محل و تعداد ضایعات ثبت می‌گردید. از بیماران اسمیر مستقیم تهیه و بخشی از نمونهٔ برداشت شده جهت جداسازی انگل عامل بیماری به محیط کشت N.N.N (Novy MacNeal Nicolle) انتقال می‌یافت سپس ایزوله‌های حاصله جهت تولید انبوه به محیط کشت RPMI 1640 همراه با ٢٠٪ از Fetal Calf Serum به عنوان مکمل انتقال می‌یافت.

پس از تولید و برداشت انگل از فاز ایستای کشت شستشوهای لازم انجام و انگل شمارش شد. سپس به کمک شمارش با لام هموستیر غلظت مناسبی از انگل تهیه و و تعداد ١٠٠ میکرولیتر محلول انگلی به درون چاهکهای پلیت‌های الایزا انتقال و به مدت ٢٤ ساعت در یخچال نگهداری شد (عمل Coating) سپس با استفاده از horse radish congugated antimouse antibody ومنوکلونال آنتی‌بادی اختصاصی گونه‌ها شامل D2 اختصاصی لیشمانیا دونووانی و اینفانتوم، T10 اختصاصی برای لیشمانیا تروپیکا، T1 اختصاصی برای لیشمانیا ماژور و T7 اختصاصی برای هر دو گونه لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا ماژور و انجام مراحل تست الایزا و استفاده از سویه‌های استاندارد پروسه لازم جهت تعیین هویت ایزوله‌ها انجام گرفت.

یافته‌ها

از ٧٤ نمونه مورد بررسی ٦٥ مورد (٨٧/٨٪) L. major و ٩ مورد (١٢/٢٪) L. tropica گزارش گردید. کمترین سن بیماران ١ ماه و بیشترین سن ٦٥ سال بود (میانگین سنی ٢٩ سال). تعداد ٤١ نفر (٥٥/٤٪) مرد بودند که ١٤/٦٪ آنها به L.tropica و ٨٥/٤٪ به L.major و ٣٣ نفر (٤٤/٦٪) زن که ٩٪ آنها به L.tropica و ٩١٪ به L.major آلوده بودند. در ٤٠ نفر (٥٤٪) ضایعه در دست، ١٨ نفر (٢٤/٣٪) در پا، ٤ نفر (٥/٤٪) در تنه و ١٢ نفر (١٦/٣٪) در صورت و گردن بود.

اشکال بالینی غیر معمول مورد مطالعه شامل ضایعات اقماری در ٣٠ نفر، اسپوروتریکوئید در ٢٥ نفر، نوع مزمن (دوره بیماری بیش از ٢ سال) در ٧ نفر، زوستریفرم در ٥ نفر، وروکوز در ٤ نفر و اریزیلوئید در ٣ نفر گزارش گردید جدول (١).

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-31]

جدول شماره ۱- توزیع فراوانی سویه‌های جدا شده به تفکیک شکل کلینیکی

شکل کلینیکی	تعداد کل	مبتلا به L.tropica	مبتلا به L.major
اقماری	۳۰ (٤٠/٥٤%)	(۱۰%)۳	(۹۰%) ۲۷
اسپوروتریکوئید	۲۵ (۳۳/۷۸%)	(۸%)۲	(۹۲%)۲۳
مزمن	۷ (۹/٤٥%)	(۲۸%) ۲	(۷۲%) ٥
زوستریفرم	٥(٦/۷٥%)	(۲۰%)۱	(۸۰%)٤
وروکوز	٤(٥/٤۰%)	۰ ۰	(۱۰۰%) ٤
اریزپلوئید	۳(٤/۰٥%)	(۳۳/۳%)۱	(٦٦/۷%)۲

جدول شماره ۲- توزیع فراوانی اشکال بالینی غیر معمول به تفکیک درمانهای انجام شده

شکل کلینیکی	درمانهای انجام شده				
	گلوکانتیم سیستمیک	تزریق داخل ضایعه گلوکانتیم + کرایوتراپی	تزریق داخل ضایعه گلوکانتیم	پماد پاراومومایسین	بدون درمان
اقماری	(۲۰%)٦	(۳/۳۳%)۱	(٦/٦٦%)۲	(۳/۳۳%)۱	(٦٦/٦%)۲۰
اسپوروتریکوئید	۰ (۰%)	(٤%)۱	(۸%)۲	(۸%)۲	(۸۰%)۲۰
مزمن	(۱٤/۲۸%)۱	۰	(٤۲/۸٥%)۳		(٤۲/۸٥%)۳
زوستریفرم	(٦۰%)۳	۰	۰	۰	(٤۰%)۲
وروکوز	۰	۰	۰		(۱۰۰%)٤
اریزپلوئید	(۳۳/۳۳%)۱		(۳۳/۳۳%)۱		(۳۳/۳۳%)۱

جدول شماره ۳- توزیع فراوانی اشکال بالینی غیر معمول به تفکیک محل ضایعات

شکل کلینیکی	محل ضایعات			
	دست	پا	تنه	صورت و گردن
اقماری	(٥۳/٤٤%)۱٦	(۲۰%)٦	(٦/٦%)۲	(۲۰%)٦
اسپوروتریکوئید	(٦٤%)۱٦	(۲۸%)۷	۰	(۸%)۲
نوع مزمن	(٥۷/۱%)٤	(۱٤/۳%)۱	۰	(۲۸/٦%)۲
زوستریفرم	(۲۰%)۱	(٦۰%)۳	(۲۰%)۱	۰
وروکوز	(٥۰%)۲	(۲٥%)۱	(۲٥%)۱	۰
اریزپلوئید	(۳۳/۳%)۱	۰	۰	(٦٦/۷%)۲

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-31]

از ٧٤ بیمار ٥٠ نفر (٦٧/٥٦٪) هیچ درمانی قبل از پیدایش ضایعات دریافت نکرده بودند و ٢٤ نفر (٣٢/٤٣٪) تحت درمانهای مختلف شامل ١١ نفر گلوکانتیم سیستمیک، ٨ نفر تزریق داخل ضایعه گلوکانتیم، ٢ نفر توأم کرایوتراپی و گلوکانتیم داخل ضایعه و ٣ نفر پماد پاروماومایسین قرار گرفته بودند (جدول ٢).

هیچکدام از ٧٤ بیمار سابقه بیماری زمینه‌ای خاصی را ذکر نکرده بودند.

از ٣٦ نفر (٤٨/٦٤٪) مراجعه کننده از شهر اصفهان در ٩ نفر (٢٥٪) L.tropica و در ٢٧ نفر (٧٥٪) L.major و از کل ٣٨ نفر (٥١/٣٥٪) مراجعه کننده از حومه L.major جدا گردید.

بحث

با توجه به نتایج حاصله از تعیین گونهٔ پروماستیگوتهای جدا شده از ٧٤ نمونه مورد نظر ٨٧/٨٪ L.major و ١٢/٢٪، L.tropica گزارش گردید. بنابراین گونه غالب L.major بوده و میتوان استنباط کرد که گونهٔ خاصی غیر از این دو سویه در ایجاد اشکال غیر معمول بر خلاف تصور ما نقشی ندارد. با توجه به جدول شماره ١ و با استفاده از آزمون Chi-Square Pvalue=٤٩٪، تفاوت معنی داری بین شکل کلینیکی غیر معمول در مبتلایان به L.major و L.tropica وجود نداشته است.

در بررسی جدول شماره ٣ عمدهٔ ضایعات اقماری، اسپوروتریکوئید، مزمن و وروکوز در دست و پا و ضایعات اریزپلوئید عمدتاً در صورت و گردن بوده‌اند (Pvalue=٠/٠٤) و تفاوت معنی داری محل ضایعات و شکل کلینیکی مشاهده می‌گردد. این مسئله که آیا مسیر لنفاتیکی در دست و پا و یا عوامل محیطی مثل در معرض تروما بودن میتوانسته در افزایش بروز بعضی اشکال بالینی در دست و پا دخالت داشته باشد جای بررسی دارد. از طرفی از کل بیماران ٢٤ نفر تحت درمانهای قبلی قرار گرفته بودند و در ٥٠ نفر درمانی صورت نگرفته بود (pvalue=٠/٢٥) و رابطه معنی داری بین اشکال غیر معمول و درمانهای انجام شده وجود نداشت. بنابراین تصور و فرضیه ما مبنی بر اینکه شاید تزریق داخل ضایعه و یا کرایوتراپی باعث ایجاد فرم‌های غیر معمول بالینی گردند را زیر سئوال می‌برد. همچنین کلیه افراد مورد مطالعه سابقه بیماری زمینه‌ای خاصی را ذکر نکرده بودند که باز در اینجا دو فرض مطرح میگردد یکی اینکه هیچ رابطه‌ای بین اشکال بالینی غیر معمول و بیماریهای زمینه‌ای وجود ندارد و دوم اینکه آزمایشات تکمیلی برای اثبات وجود بیماریهای زمینه‌ای لازم می‌باشد که در طرحهای تکمیلی آینده باید در نظر گرفته شود. بطور کلی میتوان پیشنهاد کرد که در موارد مواجه شدن با اشکال بالینی آتیپیک مطالعهٔ فاکتورهای دیگری از قبیل وضعیت ایمنی بیمار همراه با تعیین سیتوکیت‌های مختلف از جمله اینترفرون گاما و اینترلوکین II باید انجام گیرد. در این موارد مسائلی مثل پاتوژنیسیتی متفاوت سویه‌های عامل و نیز مسائل مربوط به بیمار از جمله وضع اقتصادی، تغذیه و شرایط فیزیکی بدن احتمالاً می‌تواند تاثیرات مربوط به خود را داشته باشد. و همچنین جمع‌آوری نمونه‌های بیشتر جهت تصمیم گیری دقیق‌تر در مورد نتایج و انجام آزمایشات پاراکلینیکی و معاینات دقیق‌تری روی بیماران مورد مطالعه جهت اثبات مشکلات زمینه‌ای در این موارد توصیه می‌گردد.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-31]

منابع

1. Arndt. KA, Leboit PE, robinson JK, wintrouls BU. Leishmaniasis. Cutaneous Medicine and Surgery. WB. Saunders company 1996: Volume 2, 126: 1163-70.

2. Champion. RH, Burton J.L, Ebling F.J.G. Parasitic worms and protozoa. Textbook of dermatology Rook, wilkinson Blackwell scientific publications 1992 volume 2,28: 125-58.

۳. اردهالی ص. ،رضایی ح.ر.، ندیم الف. انگل لیشمانیا و لیشمانیوزها ، لیشمانیوزپوستی،۱۳۷۳ ص۶۵-۴۷.

۴. اردهالی ص.، رضایی ح. ر.، ندیم الف. انگل لیشمانیا و لیشمانیوزها، همه گیرشناسی لیشمانیوزها در ایران ، ۱۳۷۳ ص ۲۰۱-۱۷۷.

5. Harry. L, Arnold JR, Richard B, william D, parasitic infections, stings, and bites. Disease of the skin Andrews. W.B. Saunders company 1990. Eight Edition, 20: 488-92.

۶. اصیلیان، ع. لیشمانیوز جلدی و روش‌های درمانی و پیشگیری آن، ۱۳۷۱، ص ۴۸.

۷. نصری فر، پ. تعیین گونه‌های انگل لیشمانیا پادتن‌های تک دودمانی در اصفهان. پایان نامه جهت اخذ کارشناسی ارشد علوم جانوری. ۱۳۷۸.

۸. حاتم، غ. تعیین مشخصات انگل لیشمانیا با روش ایزوآنزیم الکتروفورز. پایان نامه جهت اخذ Ph.D انگل شناسی سال ۱۳۷۵.

9. Hatam GR, Hosseini SM H, Ardehuli S. Isoenzyme studies in characterization of leishmania isolation in Iran, Iran J Med Sci 1999; 44(182): 8-13.

10. Ardehali S, Moattari A, Hatam GR, Hosseini Sm, Sharifi I. Characterization of leishmania isolated in Iran: 1. Serotyping with species specific. Monoclonal antibodies. Acta Trop, 2000, May 31; 75(3) : 301-7.

11. Mahnaz Tashakori, Soheila Aydari, Amina Kariminia, Fereidon Mahboudi, and Mohammad Hosseini Alimohammafian. Characterization of leishmania species and L.major strains in different endemic area of cutaneous leishmaniasis in Iran, Iran. Biomed J 7(2): 43-50, 2003.

12. Momeni AZ, Yotsumoto S, Mehregan DR, Mehregan AH, Mehregan AD, Amingabaheri M, Fujiwara H, Tadu J. Chronic lupoid leishmaniasis. Evaluation by polumerase chain reaction. Archires of dermatology Vol. 132, No 2, February 1996.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-31]