تأثیر محلول‌های نگه‌دارنده‌ی مختلف در فرایند انجماد بر عفونت‌زایی *لیشمانیاماژور* در مدل موشی

فرزانه زرین‌کار[۱]
دکتر علی خامسی‌پور[۲]
اکرم میرامین‌محمدی[۲]
ابراهیم اسکندری[۲]
دکتر محمود ناطقی‌رستمی[۳]
دکتر اسماعیل فلاح[۴]

۱. دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.
۲. مرکز آموزش و پژوهش بیماری‌های پوست و جذام، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۳. دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.
۴. مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

نویسنده‌ی مسئول:
دکتر اسماعیل فلاح

تبریز، خیابان آزادی، مرکز آموزشی درمانی سینا، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری.
پست الکترونیک:
fallahe@tbzmed.ac.ir

تعارض منافع: اعلام نشده است.

زمینه و هدف: لیشمانیزاسیون روشی مؤثر در پیشگیری از سالک می‌باشد. استانداردسازی *لیشمانیا* و شرایط نگه‌داری انگل از دشواری‌های این روش می‌باشد. در این مطالعه تأثیر استفاده از مواد نگه‌دارنده‌ی مختلف بر میزان عفونت‌زایی انگل بررسی شده است.

روش اجرا: انگل *Leishmania major* در مراحل رشد لگاریتمی، شروع ایستا و انتهای مرحله‌ی ایستا، قبل از انجماد و بعد از انجماد با استفاده از مواد نگه‌دارنده‌ی مختلف با ترکیبات متنوع (ساکارز، گلیسرول، ترهالوز، گلوکز، سوربیتول و dimethyl sulfoxide [DMSO]) به موش‌های BALB/c تلقیح و میزان عفونت‌زایی بررسی شد. از آزمون IFA به‌منظور تعیین میزان انگل‌های متاسیکلیک استفاده شد.

یافته‌ها: درصد انگل‌های زنده در ماده‌های نگه‌دارنده‌ی در مراحل مختلف رشد از ۸۹٪ تا ۹۸/۲٪ بود. در گروهی که انگل مرحله‌ی رشد لگاریتمی در مواد نگه‌دارنده‌ی ساکارز+ گلیسرول و DMSO دریافت کرده بودند بروز ضایعات از هفته‌ی سوم شروع و در هفته‌ی پنجم به ۱۰۰٪ رسید. درگروهی که انگل شروع مرحله‌ی ایستا و انتهای مرحله‌ی ایستا در مواد نگه‌دارنده‌های DMSO، ساکارز + گلوکز، ساکارز + گلیسرول و گلیسرول ۱۵٪ دریافت کرده بودند بروز ضایعه بین هفته‌های ۴ تا ۵ شروع و در هفته‌ی ۸ به ۱۰۰٪ می‌رسید. میزان انگل‌های متاسیکلیک در مراحل مختلف رشد لگاریتمی، شروع مرحله‌ی ایستا و خاتمه‌ی ایستا به ترتیب افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: رابطه‌ی مستقیم بین درصد زنده‌بودن انگل و میزان بروز ضایعه مشاهده گردید. ماده‌ی نگه‌دارنده‌ی ساکارز ۲۲/۵٪ + گلیسرول ۲۲/۵٪ برای حفظ عفونت‌زایی انگل مناسب می‌باشد. رابطه‌ی مستقیمی بین میزان پروماستیگوت‌های متاسیکلیک عفونت‌زا و میزان بروز ضایعه در مراحل مختلف رشد در موش BALB/c وجود دارد.

کلیدواژه‌ها: *لیشمانیا*، *لیشمانیا ماژور*، عفونت‌زایی، موش BALB/c

دریافت مقاله: ۹۱/۷/۱۲ پذیرش مقاله: ۹۱/۸/۳۰
پوست و زیبایی؛ پاییز ۱۳۹۱، دوره‌ی ۳ (۳): ۱۳۳-۱۲۵

مقدمه

لیشمانیزاسیون عبارت است از تلقیح داخل جلدی پروماستیگوت‌های زنده و فعال *لیشمانیا ماژور* در نقطه‌ای پوشیده از بدن مثل بازو که باعث بروز ضایعه‌ای شبیه سالک می‌شود و متعاقب بهبودی ضایعه، فرد *لیشمانیزه* در مقابل عفونت بعدی و ضایعات متعدد سالک مصون می‌شود. لیشمانیزاسیون ابتدا با استفاده از ترشحات ضایعات فرد مبتلا به سالک انجام می‌شد ولی در ۷۰ سال اخیر بعد از کشف محیط‌های کشت، پروماستیگوت‌های لیشمانیا برداشت‌شده از محیط کشت برای لیشمانیزاسیون در کشورهای مختلف آسیا استفاده شده است[۱]. لیشمانیزاسیون به‌عنوان برنامه‌ای برای پیش‌گیری

عمومی در برابر سالک نوع روستایی از سال ۱۹۶۵ تا ۱۹۶۷ در مناطق با اندمیسیتی بالا در جنوب ترکمنستان انجام گرفت[۲-۴]. نتایج تجارب فلسطین اشغالی نیز در لیشمانیزاسیون که به طور وسیعی از سال ۱۹۶۸ تا ۱۹۸۰ انجام گرفت قابل توجه است. این برنامه به دلیل ایجاد تعداد بسیار معدودی زخم پایدار متوقف شد[۵و۶]. در ایران در سال ۱۹۷۷ تا ۱۹۸۴ دکتر ندیم و همکاران لیشمانیزاسیون را بر روی کودکان یکی از روستاهای اطراف اصفهان به کار گرفتند. در مطالعه‌ی سال ۱۹۸۴ میزان بروز زخم بعد از تلقیح نسبت به مطالعه‌ی سال ۱۹۷۷ بالاتر بود. علت بالاتر بودن این میزان به دلیل این بوده است که در مطالعه‌ی دوم تلقیح پروماستیگوت‌ها در مرحله‌ی ایستا بوده است، در حالی که در مطالعه‌ی اول تلقیح پروماستیگوت‌ها در مرحله‌ی رشد بوده است[۷و۸].

در دوران جنگ تحمیلی ایران و عراق در حدود ۱/۵ میلیون نفر رزمنده لیشمانیزه شدند. میزان بروز سالک افراد لیشمانیزه نسبت به گروه شاهد یک به شش بود[۹]. Greenblatt و همکارانش برای لیشمانیزایسیون از انگل زنده *Leishmania major* در پاساژ مختلف استفاده می‌کردند و مشاهده کردند که قدرت بیماری‌زایی (virulence) انگل کاهش می‌یابد و برای حل این معضل از انگل‌های زنده‌ی منجمد شده استفاده کردند[۹]. با اعمال این روش باز هم میزان بروز زخم پایین بود که به‌نظر می‌رسد به دلیل استفاده از پروماستیگوت‌های فاز رشد باشد. امروزه فاز ایستا که تعداد زیادی انگل متاسیکلیک دارد استفاده می‌شود[۸و۹]. از میان نسل‌های مختلف واکسن‌های تهیه‌شده علیه لیشمانیوز، تنها واکسن‌های نسل اول تا فاز ۳ کارآزمایی بالینی پیش‌رفته و بر روی انسان ارزیابی شده‌اند. ولی محدودیت عمده در مورد تهیه‌ی انگل برای استفاده در لیشمانیزاسیون و واکسن‌های نسل اول و تهیه‌ی لیشمانین فقدان شاخص یا شاخص‌هایی است که بتوان در تهیه و استانداردکردن فرآورده‌های انگل *لیشمانیا* استفاده کرد.

یکی از دلایل مهم توقف لیشمانیزاسیون فقدان این شاخص‌هاست و شاید یکی از مهم‌ترین دلایل اختلاف نتایج و عدم تکرارپذیری کارآزمایی‌های بالینی فقدان شاخصی است که با استفاده از آن بتوان اطمینان حاصل کرد که انگل‌های کاملاً مشابهی در هر مطالعه‌ی ارزیابی میزان اثربخشی استفاده شده است. تنها شاخصی که تاکنون مورد استفاده قرار گرفته است کنترل زمان برداشت انگل از محیط کشت و استفاده از شکل‌های متاسیکلیک انگل *لیشمانیا* بوده است که متأسفانه عملاً کارآیی لازم را نداشته است. در صورتی که بتوان شاخصی که با بیماری‌زایی انگل ارتباط مستقیم داشته باشد، شناسایی کرد می‌توان از آن در کلیه‌ی مطالعات تهیه‌ی انگل برای لیشمانیزاسیون، تهیه‌ی واکسن‌های نسل اول، تهیه‌ی لیشمانین و تهیه‌ی آنتی‌ژن جهت استفاده در مطالعات ایمونولوژی استفاده کرد و نهایتاً استفاده از لیشمانیزاسیون را احیا کرد[۸و۱۰و۱۱].

علی‌رغم مطالعات زیادی که در زمینه‌ی لیشمانیزاسیون و واکسن‌های لیشمانیوز در جهان در طی چند دهه‌ی گذشته انجام گرفته است به علل مختلف از جمله نداشتن روشی برای استانداردسازی انگل لیشمانیا، انطباق این مطالعات با یکدیگر دشوار است. در این مطالعه رابطه‌ی بین مواد نگه‌دارنده ی مختلف و میزان عفونت‌زایی انگل لیشمانیا ماژور در موش‌های BALB/c مورد ارزیابی قرار می‌گیرد.

روش اجرا

کشت انگل

انگل *لیشمانیا ماژور* سویه (MRHO/IR/75/ER) از موش زخمی آلوده برداشت و به محیط کشت نیمه‌جامد Novey-MacNeal-Nicolle انتقال داده شد. بعد از رشد، انگل به محیط RPMI 1640 انتقال داده شد و حدود ۲×۱۰^{۹}/mL انگل برای انجام آزمایش

برآورد شده بود. در این مدت شمارش روزانه‌ی انگل انجام گرفت و بعد از رسیدن تعداد انگل به تعداد مورد نیاز با توجه به شمارش روزانه، انگل از مرحله ی رشد لگاریتمی، شروع ایستا و انتهای ایستا برداشت شد.

تهیه‌ی مواد نگه‌دارنده‌ی مختلف

مواد نگه‌دارنده‌ی مختلف به‌منظور رسیدن به غلظت دلخواه با phosphate buffer sulfate (PBS) رقیق شد و اتوکلاو شد.

مواد نگه‌دارنده عبارتند از: گلیسرول ۲۲٫۵٪+ ساکارز ۲۲٫۵٪، گلیسرول ۱۵٪، گلوکز ۲۲٫۵٪+ ساکارز ۲۲٫۵٪، سوربیتول ۱۵٪، ترهالوز ۱۵٪ و DMSO (dimethyl sulfoxide) + FBS (fetal bovine serum) بعد از شمارش انگل به تعداد $۷٫۵\times۱۰^{۷}$/mL، ماده‌ی نگه‌دارنده‌ی مورد نظر با PBS به حجم ۱٫۲ سی‌سی رسانده شد. برای تهیه‌ی DMSO+FBS، تعداد $۷٫۵\times۱۰^{۷}$/ml انگل با ۹۰۰ میکرولیتر FCS و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO (10%) خنک مخلوط شد.

شمارش کلی انگل *L. major* / شمارش انگل *L. major* زنده

شمارش انگل در مرحله‌ی رشد لگاریتمی، شروع مرحله‌ی ایستا و انتهای مرحله‌ی ایستا قبل از فریز و بعد از ذوب در مواد نگه‌دارنده‌ی مختلف انجام گرفت. ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون رقیق‌شده‌ی انگل در محیط کشت RPMI 1640 برداشت شد و به منظور شمارش کلی انگل (مرده و زنده) با ۹۰ میکرولیتر فرمالین ۱۰٪ مخلوط شد و انگل با استفاده از لام هموسایتومتر شمارش شد. به منظور شمارش انگل زنده ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون رقیق‌شده‌ی انگل در محیط کشت RPMI 1640 برداشت و با ۹۰ میکرولیتر تریپان‌بلو مخلوط شد و زیر لام هموسایتومتر انگل زنده شمارش شد. با توجه به این‌که انگل زنده رنگ را به خود نمی‌گیرد و بی‌رنگ می‌شود ولی انگل مرده با جذب رنگ به رنگ آبی تیره درمی‌آید، انگل زنده از مرده تشخیص داده شد.

فریز / ذوب انگل *L. major*

در مرحله‌ی رشدلگاریتمی، شروع ایستا و انتهای ایستا، انگل *L. major* در مواد نگه‌دارنده‌ی مختلف ابتدا به مدت دو ساعت در $-۲۰^{O}C$ و سپس به مدت ۲۴ ساعت در در $-۸۰^{O}C$ نگه‌داری شد و بعد از آن به ازت مایع $-۱۹۶^{O}C$ انتقال داده شد. به‌منظور ذوب، انگل *L. major* در مواد نگه‌دارنده‌ی مختلف از ازت مایع $-۱۹۶^{O}C$ خارج و به آب $۳۷^{O}C$ منتقل شد.

تزریق انگل به موش BALB/c

تزریق زیرجلدی انگل *L. major* به تعداد ۲×۱۰^{۶}/mL به کف پای چپ موش BALB/c ماده هشت هفته‌ای در مرحله‌ی رشد لگاریتمی، شروع ایستا و انتهای ایستا قبل از انجماد و بعد از انجماد انجام گرفت. هر هفته بروز ضایعه و سیر افزایش ضخامت کف پا و تشکیل زخم در موش مورد بررسی قرار گرفت و این پایش تا ۷ هفته ادامه یافت.

آزمون ایمونوفلورسانس غیر مستقیم (IFA)

تعداد ۱×۱۰^{۷}/mL انگل *L. Major* از محیط کشت RPMI 1640 با فرمالین ۱۰٪، هم‌حجم انگل مجاور شد و بعد از نیم ساعت انکوبه در هوای اطاق، با PBS حاوی Tween20 سه بار شست‌وشو داده شد. انگل‌ها روی لام گذاشته شد در هر فیلد با بزرگ‌نمایی ۴۰ در حدود ۸۰ تا ۱۰۰ پروماستیگوت وجود داشت.

سرم Rabbit Anti Leishman (RAL) با PBS به رقت‌های $\frac{۱}{۱۰۰}$، $\frac{۱}{۲۰۰}$، $\frac{۱}{۴۰۰}$ و $\frac{۱}{۸۰۰}$ رسانده شد. fluorescent anti rabbit globuline (F-anti-R glob) طبق دستورالعمل رقیق شد و در -۸۰^{oC} نگه‌داری شد. رقت‌های مختلف RAL با F-anti-R glob بر روی آنتی‌ژن‌های فیکس‌شده روی لام اضافه شد. میزان پروماستیگوت‌های متاسیکلیک عفونت‌زای انگل در زیر میکروسکوپ فلورسانس بررسی شد. با مشاهده‌ی حدود ده انگل در هر فیلد ۱+، حدود بیست انگل در هر فیلد ۲+، حدود سی انگل در هر فیلد ۳+ و حدود بیش از چهل انگل ۴+ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تعداد موش‌های زخمی قبل از فریز انگل *L. major* سویه (MRHO/IR/75/ER) در مرحله‌رشد لگاریتمی، شروع ایستا و انتهای ایستا: انگل *L. major* در مراحل رشد لگاریتمی، شروع ایستا و انتهای ایستا برداشت شد و به ۷ سر موش BALB/c تلقیح گردید. سپس موش‌ها از نظر بروز ضایعه تا ۸ هفته بررسی شدند. جدول ۱ نتایج شمارش موش‌های زخمی را نشان می‌دهد.

درصد انگل‌های *L. major* زنده بعد از انجماد انگل در مواد نگه‌دارنده‌ی مختلف و ذوب انگل: انگل *L. major* در مرحله‌ی رشد لگاریتمی، شروع ایستا و انتهای ایستا برداشت شد و بعد از انجماد در مواد نگه‌دارنده ی مختلف و ذوب، درصد انگل‌های زنده توسط رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو به‌دست آمد (جدول ۲).

تعداد موش‌های زخمی بعد از تلقیح انگل *L. major* سویه (MRHO/IR/75/ER) پس از انجماد و ذوب انگل: انگل *L. Major* در مراحل رشد لگاریتمی، شروع ایستا و انتهای ایستا برداشت شد و بعد از نگه‌داری در مواد نگه‌دارنده، انجماد و سپس ذوب شد و پس از تلقیح به ۵ سر موش BALB/c به مدت ۸ هفته

جدول ۱: بروز هفتگی ضایعه پس از تلقیح انگل *L. major* و مراحل مختلف رشد

مرحله‌ی رشد انگل / هفته	مرحله‌ی رشد لگاریتمی	شروع مرحله‌ی ایستا	انتهای مرحله‌ی ایستا
اول	۰	۰	۰
دوم	۰	۰	۰
سوم	۰	۰	۰
چهارم	۰	۰	۰
پنجم	۰	۵/۷	۷/۷
ششم	۳/۷	۵/۷	۷/۷
هفتم	۵/۷	۵/۷	۷/۷
هشتم	۵/۷	۵/۷	۷/۷

جدول ۲: درصد انگل‌های زنده *L. major* در مواد نگه‌دارنده‌ی مختلف و مراحل مختلف رشد پس از ذوب

مرحله‌ی رشد انگل / ماده‌ی نگه‌دارنده	مرحله‌ی رشد لگاریتمی	شروع مرحله‌ی ایستا	انتهای مرحله‌ی ایستا
ساکارز ۲۲/۵٪ + گلیسرول ۲۲/۵٪	٪ ۹۲/۵	٪۸۹	٪۹۲
ساکارز ۲۲/۵٪ + گلوکز ۲۲/۵٪	٪۶۶	٪۹۸/۲	٪۹۸
گلیسرول ۱۵٪	٪ ۸۶/۲	٪۹۲	٪۹۶
ترهالوز ۱۵٪	٪۸۴	٪۷۵/۲	٪۸۳
DMSO	٪ ۹۷/۴	٪۹۷	٪۹۵
سوربیتول ۱۵٪	٪۸۲	٪۸۰	٪۸۲

پایش شد که نتایج شمارش موش‌های زخمی در جداول ۳ تا ۵ ارائه شده است.

تعیین میزان انگل‌های متاسیکلیک عفونت‌زا: از مراحل رشد لگاریتمی، شروع ایستا و انتهای ایستا انگل *L. major* برداشت شد و آزمون IFA انجام شد. نتایج مشاهدات انگل‌های متاسیکلیک عفونت‌زا زیر میکروسکوپ فلوئورسنت به شرح جدول ۶ است.

بحث

لیشمانیزاسیون سابقه‌ای طولانی دارد و تاکنون تنها راه مؤثر در کنترل سالک در مناطق مختلف خاورمیانه بوده است. مهم‌ترین دلیل توقف استفاده از این روش، فقدان شاخصی برای استانداردسازی روش تهیه و نگه‌داری *لیشمانیا* می‌باشد. از آن‌جایی که به دلیل استفاده از انگل زنده و تکثیر سریع پروماستیگوت‌ها تا زمان انجام تحقیق، معمولاً تعداد پروماستیگوت‌های تلقیح شده از یک فرد به فرد دیگر ثابت و کاملاً استاندارد نیست و هنگام لیشمانیزاسیون مقداری از آنتی‌ژن‌های محیط کشت نیز به همراه انگل به بدن فرد تزریق می‌شوند که ممکن است در تلقیح مجدد باعث حساسیت و شوک شود[۱۲] لذا فقدان ترکیبات مناسب به عنوان نگه‌دارنده در مراحل انجماد انگل و

جدول ۳: تعداد موش‌های زخمی متعاقب تلقیح انگل *L. major* در مرحله‌ی رشد لگاریتمی

هفته / ماده‌ی نگه‌دارنده	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸
ساکارز ۲۲/۵٪ + گلیسرول ۲۲/۵٪	۰	۰	۰	۰	۳/۵	۳/۵	۵/۵	۵/۵
ساکارز ۲۲/۵٪ + گلوکز ۲۲/۵٪	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۴/۵
گلیسرول ۱۵٪	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
ترهالوز ۱۵٪	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۳/۵
DMSO	۰	۰	۰	۱/۵	۳/۵	۴/۵	۵/۵	۵/۵
سوربیتول ۱۵٪	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰

محیط کشت بدون سرم مزید بر علت است و عدم امکان لیوفیلیزه‌کردن انگل نیز بر مشکلات فوق می‌افزاید. انگل‌های تهیه شده در مراحل مختلف رشد انگل در مناطق مختلف جهان، حاکی از تفاوت میزان بروز ضایعه بعد از تلقیح انگل زنده از صفر تا ۱۰۰٪ بوده است. هم‌چنین کاهش عفونت‌زایی انگل به علت کشت‌های پی‌درپی انگل و بروز ضایعات طولانی‌مدت که بعضاً به درمان پاسخ نمی‌دادند باعث توقف استفاده از لیشمانیزاسیون شد[۸و۱].

پژوهش‌های عمیق در راستای استانداردکردن روش کشت *لیشمانیا* لازم است تا تهیه‌ی انگل‌های مشابه برای استفاده در تلقیح به میزبان، تهیه لیشمانین و تهیه‌ی آنتی‌ژن‌های خام استفاده شود. از آن‌جایی که استفاده از ماده‌ی نگه‌دارنده‌ی مناسب در طول زمان انجماد انگل باعث حفظ بیشترین حالت عفونت‌زایی انگل و موفقیت لیشمانیزاسیون را تا حدود زیادی تضمین می‌کند. درصورتی که بتوان انگل‌های کاملاً مشابهی را بعد از انجماد و ذوب‌کردن در مواد نگه‌دارنده‌ی مناسب به کار برد و این مواد نگه‌دارنده قادر به حفظ عفونت‌زایی انگل باشند می‌توان از این مواد نگه‌دارنده برای انجماد انگل زنده به منظور لیشمانیزاسیون به کار برد. بنابراین شناخت ماده‌ی نگه‌دارنده‌ی مناسب از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

در مطالعه‌ی حاضر میزان بروز زخم در موش BALB/c در مرحله‌ی رشد لگاریتمی، شروع مرحله‌ی ایستای رشد و انتهای مرحله‌ی ایستا به ترتیب افزایش می‌یابد. این موضوع به دلیل وجود نسبت بیشتر انگل‌های متاسیکلیک عفونت‌زا در مرحله‌ی ایستا نسبت به مرحله‌ی لگاریتمی است.

در مرحله‌ی رشد لگاریتمی درصد انگل‌های زنده در ماده‌ی نگه‌دارنده‌ی ساکارز + گلیسرول و ماده‌ی نگه‌دارنده‌ی DMSO بیشتر از سایر مواد نگه‌دارنده است. در مواجهه‌ی موش‌ها با انگل‌های موجود در مواد نگه‌دارنده‌ی ساکارز + گلیسرول و ماده‌ی نگه‌دارنده‌ی

جدول ۴: تعداد موش‌های زخمی متعاقب تلقیح انگل *L. major* در شروع مرحله‌ی ایستا

هفته / ماده‌ی نگه‌دارنده	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸
ساکارز ۲۲/۵٪ + گلیسرول ۲۲/۵٪	۰	۰	۰	۰	۱/۵	۱/۵	۴/۵	۵/۵
ساکارز ۲۲/۵٪ + گلوکز ۲۲/۵٪	۰	۰	۰	۱/۵	۱/۵	۳/۵	۵/۵	۵/۵
گلیسرول ۱۵٪	۰	۰	۰	۰	۲/۵	۲/۵	۴/۵	۵/۵
ترهالوز ۱۵٪	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۳/۵	۳/۵
DMSO	۰	۰	۰	۳/۵	۵/۵	۵/۵	۵/۵	۵/۵
سوربیتول ۱۵٪	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱/۵	۴/۵

جدول ۵: تعداد موش‌های زخمی متعاقب تلقیح انگل *L. major* در انتهای مرحله‌ی ایستا

هفته / ماده‌ی نگه‌دارنده*	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸
ساکارز ۲۲/۵٪ + گلیسرول ۲۲/۵٪	۰	۰	۰	۰	۱/۵	۲/۵	۴/۵	۵/۵
ساکارز ۲۲/۵٪ + گلوکز ۲۲/۵٪	۰	۰	۰	۲/۵	۳/۵	۴/۵	۴/۵	۵/۵
گلیسرول ۱۵٪	۰	۰	۰	۰	۲/۵	۲/۵	۳/۵	۵/۵
DMSO	۰	۰	۰	۴/۵	۵/۵	۵/۵	۵/۵	۵/۵
سوربیتول ۱۵٪	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۴/۵

* موش‌های تلقیح‌شده با ترهالوز ۱۵٪ فقط در این مرحله از بین رفتند.

DMSO، میزان بروز ضایعه در موش‌ها سریع‌تر اتفاق افتاده است. در مرحله‌ی شروع ایستا درصد انگل‌های زنده در مواد نگه‌دارنده‌ی ساکارز + گلیسرول و ساکارز + گلوکز و گلیسرول ۱۵٪ و DMSO بالاتر می‌باشد. در مواجهه‌ی موش‌ها با انگل‌های موجود در مواد نگه‌دارنده‌ی ساکارز + گلیسرول و ساکارز + گلوکز و گلیسرول ۱۵٪ و DMSO میزان بروز ضایعه در موش‌ها سریع‌تر اتفاق افتاده است. در مرحله‌ی انتهای ایستا انگل‌های نگه‌داری شده در مواد نگه‌دارنده‌ی ساکارز + گلیسرول و ساکارز + گلوکز و گلیسرول ۱۵٪ و DMSO دارای درصد انگل زنده‌ی بالایی نسبت به ترهالوز و سوربیتول هستند. هم‌چنین میزان بروز ضایعه در موش با انگل‌های موجود در این مواد نگه‌دارنده ی ساکارز + گلیسرول و ساکارز + گلوکز و گلیسرول ۱۵٪ و DMSO سریع‌تر اتفاق افتاده است. درحالی که در سوربیتول با درصد انگل‌های زنده‌ی پایین، میزان بروز ضایعه در موش با روند زمانی خیلی کند اتفاق می‌افتد. با توجه به این یافته‌ها می‌توان نتیجه گرفت که رابطه‌ی مستقیمی بین میزان انگل زنده در ماده‌ی نگه‌دارنده با میزان بروز ضایعه در موش وجود دارد.

در مطالعه‌ی حاضر در مرحله‌ی رشد لگاریتمی، بعد از تلقیح انگل‌های موجود در مواد نگه‌دارنده‌ی ساکارز + گلوکز، ترهالوز ۱۵٪ ، گلیسرول ۱۵٪ و سوربیتول ۱۵٪، تنها در هفته‌ی هشتم قادر به ایجاد ضایعه در تعداد معدودی موش هستند لذا مواد ذکرشده برای حفظ عفونت‌زایی انگل در این مرحله قابل قبول نیست. اما بعد از تلقیح انگل‌های موجود در مواد نگه‌دارنده‌ی ساکارز + گلیسرول و DMSO در هفته‌ی پنجم در ۳ سر موش از ۵ سر موش ضایعه ایجاد شد که شرایط خوبی را برای حفظ عفونت‌زایی انگل ایجاد می‌کند. در شروع مرحله‌ی ایستا بعد از نگه‌داری انگل‌ها در مواد نگه‌دارنده‌ی DMSO، ساکارز + گلوکز، ساکارز + گلیسرول و گلیسرول ۱۵٪ و تلقیح به موش میزان بروز ضایعه در موش از هفته‌ی چهارم یا پنجم بالا می‌رود که به نظر می‌رسد این مواد نگه‌دارنده، محیط مناسبی را برای حفظ عفونت‌زایی انگل بعد از ذوب ایجاد کرده‌اند. انگل‌های موجود در مواد نگه‌دارنده‌ی سوربیتول و ترهالوز هم از هفته‌ی هفتم بعد از تلقیح شروع به ایجاد ضایعه در موش کرد که رضایت‌بخش نیست. میزان بروز زخم در موش در انتهای مرحله‌ی ایستا بعد از نگه‌داری انگل در مواد نگه‌دارنده‌ی DMSO، ساکارز + گلوکز، ساکارز + گلیسرول و

جدول ۶: پروماستیگوت‌های متاسیکلیک عفونت‌زا در مراحل مختلف رشد انگل *L. major* با استفاده از آزمون IFA

مراحل مختلف رشد	انگل‌های متاسیکلیک عفونت‌زا
رشد لگاریتمی	+۱
شروع ایستا	+۲
انتهای ایستا	+۴

گلیسرول ۱۵٪ و پس از تلقیح از هفته‌ی چهارم یا پنجم بالا می‌رود که به نظر می‌رسد این مواد نگه‌دارنده، محیط مناسبی را برای حفظ عفونت‌زایی انگل بعد از ذوب ایجاد کرده‌اند. انگل موجود در مواد نگه‌دارنده‌ی سوربیتول و ترهالوز از هفته‌ی هفتم بعد از تلقیح شروع به ایجاد زخم در موش کرد که رضایت‌بخش نیست. با توجه به این یافته‌ها می‌توان گفت ماده‌ی نگه‌دارنده‌ی ساکارز ۲۲/۵٪ + گلیسرول ۲۲/۵٪ محیط مناسبی را برای عفونت‌زایی انگل و ایجاد ضایعه در موش در شرایط انجماد در مراحل رشد لگاریتمی، شروع ایستا و انتهای ایستا ایجاد می‌کند و ماده‌ی نگه‌دارنده‌ی DMSO هرچند که شرایط خوبی را برای حفظ عفونت‌زایی انگل در مراحل رشد لگاریتمی، شروع ایستا و انتهای ایستا داراست ولی به علت سمیت در انسان قابل استفاده نیست.

با توجه به تغییرات هفتگی تعداد موش‌های زخمی به کل پس از تلقیح انگل *L. major* در مرحله‌ی رشد لگاریتمی، میزان بروز ضایعه در موش در هفته‌ی پنجم در ۷ موش تلقیح شده هیچ ضایعه‌ای ایجاد نشد و در شروع مرحله‌ی ایستا در ۵ سر موش و در انتهای توجه مرحله‌ی ایستا در ۷ سر موش ضایعه ایجاد شد. با مشاهدات آزمون IFA، به ترتیب در مراحل رشد لگاریتمی، شروع مرحله‌ی ایستا و انتهای مرحله‌ی ایستا پروماستیگوت‌های متاسیکلیک عفونت‌زا افزایش می‌یابد. پس می‌توان نتیجه گرفت رابطه‌ی مستقیمی بین میزان پروماستیگوت‌های متاسیکلیک عفونت‌زا و میزان بروز ضایعه در مراحل مختلف رشد در موش BALB/c وجود دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی تبریز بوده و آزمایشات مربوطه در مرکز پوست و جذام دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفته است. بدین‌وسیله از مساعدت‌ها و راهنمایی‌های ریاست محترم مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی تبریز جناب آقای دکتر بهروز نقیلی و همکاران شورای پژوهشی و مساعدت‌ها و راهنمایی‌های ریاست محترم مرکز آموزش و پژوهش بیماری‌های پوست و جذام دانشگاه علوم پزشکی تهران جناب آقای دکتر دولتی و همکاران کمال تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید.

References

1. Khameshipour A, Rafati S, Davoudi N, et al. Leishmanisis vaccine candidates for development: A global overview. Indian J Med Research 2006; 123: 423-38.
2. Sergiev P, Beislikhem R, et al. Results of mass vaccination against zoonotic cutaneous leishmaniasis. Med Parasitol 1970; 39: 541-51.
3. Gafurov IM. Experience in controlling and preventing zoonotic cutaneous leishmaniasis in Uzbekistan. Med Parazitol (Mosk) 1999; 58-9.
4. Sergiev V. control and prophylaxis of cutaneous leishmaniasis in the middle Asia republics of the former USSR. Bull Soc Franc Parasitol 1992; 10: 183-7.
5. Greenblatt CL, Schnur LF. Leishmanization and follow up. Meeting on leishmanization as challenge for evaluation of candidate vaccine, Samarkand, Uzbekistan. 11-12 Mar. 1997.
6. Koufman Z, Egos N, Green blatt CL, et al. Observations on immunization against cutaneous leishmaniasis in Israel. Isr J Med Sci 1978; 14: 218-22.
7. Nadim A, Javadian E, Tahvildari GH, Ghorbani M. Effectiveness of leishmanization in contol of cutaneous leishmaniasis. Bull. Soc Path Exo 1983; 76: 383-97.

8. Nadim A, Javadian E, Mohebali M. The experience of leishmanization in the Islamic Republic of Iran. Eastern Mediterranean Health J, 1997; 3: 284-9.
9. Khameshipour A, Dowlati Y, Asilian A, et al. Leishmanization: Use of an old method for evaluation of candidate vaccines against leishmaniasis. Vaccine 2005, 23: 3642-8.
10. Noazin S, Modabber F, Khamesipour A, et al. First generation leishmaniasis vaccines: a review of field efficacy trials. Vaccine 2008; 26: 6759-67.
11. Mohebali M, Hamzavi Y, Fallah E, Zareii Z. Study of canine visceral leishmaniasis in some parts of Islamic Republic of Iran and its health importance. J Faculty of Veterinary Medicine University of Tehran 2001; 56 : 9-65.
12. UNDP/World Bank/WHO/TDR: Report of meeting on leishmanization as challenge for evaluation of candidate vaccine. Geneva, Switzerland, 11-12 Mar. 1997.

Effect of different preservatives during freezing process on infectivity of *Leishmania major* in mice model

Farzaneh Zarrinkar, MSc[1]
Ali Khamesipour, PhD[2]
Akram Miraminmohammadi, MSc[2]
Seyyed Ebrahim Eskandari, MSc[2]
Mahmoud Nateghi Rostami, PhD[3]
Esmaeil Fallah, PhD[4]

1. Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
2. Center for Research and Training in Skin Diseases and Leprosy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3. Faculty of Public Health, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.
4. Tropical and Infectious Disease Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

Corresponding Author:
Esmaeil Fallah, PhD

Tropical and Infectious Disease Research Center, Sina Hospital, Azadi Avenue, Tabriz, Iran.
Email: Fallahe@tbzmed.ac.ir

Conflict of interest: None to declare

Background and Aim: Leishmanization (LZ) is an effective tool to prevent cutaneous leishmaniasis. Standardization of *Leishmania* is the main drawback of LZ. The aim of this study was to assess the effect of various preservatives on the infectivity of *Leishmania*.

Methods: *L .major* harvested at different stages of growth; logarithmic, early and late stationary phases were frozen using various preservatives of saccharose, glycerol, trehalose, glucose, sorbitol, and dimethyl sulfoxide (DMSO). The harvested parasites were inoculated into BALB/c mice before and after freezing. The infectivity of the parasites was checked. IFA test was used to assess the rate of metacyclic parasite.

Results: The ratio of live *Leishmania* in different growth stages and various preservatives were 89.0% to 98.2%. The lesion development in groups of mice which received *Leishmania* in sacarose + glycerol or DMSO was started from 3rd week and at 5th week all the mice showed lesion. The group of mice which were inoculated with early or late stationary phases in saccharose + glucose, saccharose + glycerol, glycerol 15% or DMSO showed lesion from 4th to 5th week and in 100% showed lesions at 8th week. The rate of metacyclic parasites increases from log phase to early and late stationary phases.

Conclusion: There was a correlation between percent of live parasite and the rate of lesion development in BALB/c mice. Saccharose 22.5% + Glyserol 22.5% were the most appropriate preservative to freeze *L. major*. IFA test is used to detect metacyclic *Leishmania*. A correlation was seen between the rate of lesion development in BALB/c mice and IFA positivity.

Keywords: *Leashmania*, *Leishmania major*, virulence, BALB/c mouse

Received: Oct 2, 2012 Accepted: Nov 20, 2012

Dermatology and Cosmetic 2012; 3 (3): 125-133