

بررسی هویت گونه‌های انگل لیثمانیا در اشکال بالینی غیر معمول لیثمانیوز 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: لیثمانیوز جلدی بیماری انگلی است که توسط گونه‌های مختلف انگل لیثمانیا 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 لیثمانیا در این موارد بوده است.

مواد و روشها: این مطالعه از نوع توصیفی و روش نمونه‌گیری 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 RPMI ۱۶۴۰ 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 ۷۴ 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 ۴۰/۵۴٪ اسپوروتریکونید ۳۳/۷۸٪، ضایعات مزمن (بیش از ۲ سال) ۹/۴۵٪، زوستریفرم ۶/۷۵٪، وروکوز ۵/۴٪ و اریزپلونید ۴/۰۵٪ بودند تعداد ۵۰ نفر (۶۷/۵۶٪) از بیماران هیچ درمانی قبل از بروز ضایعات آنتی‌بیوتیک دریافت نکرده و ۲۴ نفر (۳۲/۴۳٪) تحت درمانهای مختلف قرار گرفته بودند. از ۷۴ بیمار ۳۶ نفر از شهر اصفهان بودند که در آنها ۲۵٪ *L. tropica* و ۷۵٪ *L. major* جدا گردید و از کل ۳۸ نفر مراجعه کننده از حومه *L. major* جدا شد.

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

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 یاندرول 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 ۶ 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 نمی‌توان لیشمانیوز جلدی ناشی از *L. major* و *L. tropica* را از یکدیگر بازشناخت (۳ و ۴). 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 رسیدیواتس 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 گونه دیگری از لیشمانیا وجود دارد (۱). در رفرائنس 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 درگیر می‌کند (۲). در اشکال بالینی زونایی یا زوستریفرم و در مواردیکه ضایعات اقماری ایجاد می‌شوند، معمولاً سیر بیماری پیشرونده می‌باشد. شکل کلینیکی باده‌سرخ که بیشتر اوقات روی گونه‌های خانم‌های مسن وقوع می‌یابد که شیوع جوشگاه در این مورد کمتر می‌باشد (۶). در فرم‌های اسپوروتریکوئید انتشار ضایعه در مسیر لنفاتیک وجود دارد. از اشکال بالینی دیگر نوع کلونیدال و زگیلی می‌باشند که در اندام تحتانی گزارش شده‌اند (۲) و نوع پسونیازیفرم 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. بهر حال در مطالعه‌ای که در اصفهان انجام شده و گونه‌های انگل لیشمانیا توسط پادتن‌های تک دودمانی تعیین گردیده است در ۸۳٪ *L. major* و در ۷۷٪ *L. tropica* و در ۱۰٪ نتایج مشکوک گزارش گردیده است (۷). همچنین در مطالعه 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 (۹۸).

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 آنتی‌بادیهای منوکلونال روی نمونه‌های جمع‌آوری شده از هفت ناحیه مختلف آندمیک ایران انجام شده است از ۷۷ نمونه ایزوله شده در ۴۲ مورد لیشمانیا ماژور و ۲۲ مورد لیشمانیا تروپیکا و ۵ مورد *Crithidia luciliae* جدا گردید، و در

تعداد ۱۰۰ میکرولیتر محلول انگلی به درون چاهکهای پلیت‌های الیزا انتقال و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شد (عمل Coating) سپس با استفاده از horse radish conjugated antimouse antibody و منوکلونال آنتی‌بادی اختصاصی گونه‌ها شامل D2 اختصاصی لیشمانیا دونووایی و ایفانتوم، T10 اختصاصی برای لیشمانیا تروپیکا، T1 اختصاصی برای لیشمانیا مازور و T7 اختصاصی برای هر دو گونه لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا مازور و انجام مراحل تست الیزا و استفاده از سویه‌های استاندارد پروسه لازم جهت تعیین هویت ایزوله‌ها انجام گرفت.

نمونه‌های جدا شده از اصفهان ۱۵ مورد لیشمانیا تروپیکا و ۵ مورد لیشمانیا مازور گزارش گردیده است (۱۱).

از مطالعات دیگر که در ایران انجام گرفته است استفاده از PCR در بیماران با لوپوئید لیشمانیوز بوده است که توانسته‌اند در ۳۰ نفر از ۶۳ بیمار با این روش انگل را جدا کنند ولی گونه‌های آن گزارش نگردیده است (۱۲). با توجه به مطالب فوق و نامشخص بودن گونه‌های عامل در ضایعات غیر معمول کلینیکی سالک به نظر رسید که تعیین هویت انگل در اشکال آنیپیک بیماری امری ضروری می‌باشد تا با توجه به آن بتوان اقدام پیشگیری کننده لازم و تدبیرات درمانی مؤثری را برای این بیماران اتخاذ نمود.

یافته‌ها

از ۷۴ نمونه مورد بررسی ۶۵ مورد (۸۷/۸٪) *L. major* و ۹ مورد (۱۲/۲٪) *L. tropica* گزارش گردید. کمترین سن بیماران ۱ ماه و بیشترین سن ۶۵ سال بود (میانگین سنی ۲۹ سال). تعداد ۴۱ نفر (۵۵/۴٪) مرد بودند که ۱۴/۶٪ آنها به *L. tropica* و ۸۵/۴٪ به *L. major* و ۳۳ نفر (۴۴/۶٪) زن که ۹٪ آنها به *L. tropica* و ۹۱٪ به *L. major* آلوده بودند. در ۴۰ نفر (۵۴٪) ضایعه در دست، ۱۸ نفر (۲۴/۳٪) در پا، ۴ نفر (۵/۴٪) در تنه و ۱۲ نفر (۱۶/۳٪) در صورت و گردن بود.

اشکال بالینی غیر معمول مورد مطالعه شامل ضایعات اقماری در ۳۰ نفر، اسپوروتریکوئید در ۲۵ نفر، نوع مزمن (دوره بیماری بیش از ۲ سال) در ۷ نفر، زوسترiform در ۵ نفر، وروکوز در ۴ نفر و اریزپلوئید در ۳ نفر گزارش گردید (جدول ۱).

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع توصیفی و روش نمونه‌گیری 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 نمونه برداشت شده جهت جداسازی انگل عامل بیماری به محیط کشت (Novy MacNeal N.N.N) (Nicolle) انتقال می‌یافت سپس ایزوله‌های حاصله جهت تولید انبوه به محیط کشت RPMI 1640 همراه با ۲۰٪ 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

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

شکل کلینیکی	تعداد کل	مبتلا به <i>L.tropica</i>	مبتلا به <i>L.major</i>
اقماری	۳۰ (۴۰/۵۴%)	۳ (۱۰%)	۲۷ (۹۰%)
اسپوروتریکوئید	۲۵ (۳۳/۷۸%)	۲ (۸%)	۲۳ (۹۲%)
مزمین	۷ (۹/۴۵%)	۲ (۲۸%)	۵ (۷۲%)
زوستریفرم	۵ (۶/۷۵%)	۱ (۲۰%)	۴ (۸۰%)
وروکوز	۴ (۵/۴۰%)	۰	۴ (۱۰۰%)
اریزپلوئید	۳ (۴/۰۵%)	۱ (۳۳/۳%)	۲ (۶۶/۷%)

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

شکل کلینیکی	گلوکانتیم سیستمیک	درمان‌های انجام شده		
		تزریق داخل ضایعه گلوکانتیم + کرایوترابی	تزریق داخل ضایعه گلوکانتیم	پماد پاراموایسین
اقماری	۶ (۲۰%)	۱ (۳/۳۳%)	۲ (۶/۶۶%)	۱ (۳/۳۳%)
اسپوروتریکوئید	۰ (۰%)	۱ (۴%)	۲ (۸%)	۲ (۸%)
مزمین	۱ (۱۴/۲۸%)	۰	۳ (۴۲/۸۵%)	۳ (۴۲/۸۵%)
زوستریفرم	۳ (۶۰%)	۰	۰	۲ (۴۰%)
وروکوز	۰	۰	۰	۴ (۱۰۰%)
اریزپلوئید	۱ (۳۳/۳۳%)	۰	۱ (۳۳/۳۳%)	۱ (۳۳/۳۳%)

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

شکل کلینیکی	محل ضایعات			
	دست	پا	تنه	صورت و گردن
اقماری	۱۶ (۵۳/۴۴%)	۶ (۲۰%)	۲ (۶/۶%)	۶ (۲۰%)
اسپوروتریکوئید	۱۶ (۶۴%)	۷ (۲۸%)	۰	۲ (۸%)
نوع مزمین	۴ (۵۷/۱%)	۱ (۱۴/۳%)	۰	۲ (۲۸/۶%)
زوستریفرم	۱ (۲۰%)	۳ (۶۰%)	۱ (۲۰%)	۰
وروکوز	۲ (۵۰%)	۱ (۲۵%)	۱ (۲۵%)	۰
اریزپلوئید	۱ (۳۳/۳%)	۰	۰	۲ (۶۶/۷%)

شکل کلینیکی مشاهده می‌گردد. این مسئله که آیا مسیر لنفاتیکی در دست و پا و یا عوامل محیطی مثل در معرض تروما بودن میتواند در افزایش بروز بعضی اشکال بالینی در دست و پا دخالت داشته باشد جای بررسی دارد. از طرفی از کل بیماران ۲۴ نفر تحت درمانهای قبلی قرار گرفته بودند و در ۵۰ نفر درمانی صورت نگرفته بود ($pvalue=0/25$) 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 سؤال 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 آنییک مطالعه 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 پاتوژنیسیته متفاوت سویه‌های عامل و نیز مسائل مربوط به بیمار از جمله وضع اقتصادی، تغذیه و شرایط فیزیکی بدن احتمالاً می‌تواند تأثیرات مربوط به خود را داشته باشد. و همچنین جمع‌آوری نمونه‌های بیشتر جهت تصمیم‌گیری دقیق‌تر در مورد نتایج و انجام آزمایشات پاراکلینیکی و معاینات دقیق‌تری روی بیماران مورد مطالعه جهت اثبات مشکلات زمینه‌ای در این موارد توصیه می‌گردد.

از ۷۴ بیمار ۵۰ نفر (۶۷/۵۶٪) هیچ درمانی قبل از پیدایش ضایعات دریافت نکرده بودند و ۲۴ نفر (۳۲/۴۳٪) تحت درمانهای مختلف شامل ۱۱ نفر گلوکاتیم سیستمیک، ۸ نفر تزریق داخل ضایعه گلوکاتیم، ۲ نفر توام کرایوتراپی و گلوکاتیم داخل ضایعه و ۳ نفر پماد پاراموماسین قرار گرفته بودند (جدول ۲).

هیچکدام از ۷۴ بیمار سابقه بیماری زمینه‌ای خاصی را ذکر نکرده بودند.

از ۳۶ نفر (۴۸/۶۴٪) مراجعه کننده از شهر اصفهان در ۹ نفر (۲۵٪) *L.tropica* و در ۲۷ نفر (۷۵٪) *L.major* و از کل ۳۸ نفر (۵۱/۳۵٪) مراجعه کننده از حومه *L.major* جدا گردید.

بحث

با توجه به نتایج حاصله از تعیین گونه پروماستیگوتهای جدا شده از ۷۴ نمونه مورد نظر ۸۷/۸٪ *L.major* و ۱۲/۲٪ *L.tropica* گزارش گردید. بنابراین گونه غالب *L.major* بوده و میتوان استنباط کرد که گونه خاصی غیر از این دو سویه در ایجاد اشکال غیر معمول بر خلاف تصور ما نقشی ندارد. با توجه به جدول شماره ۱ و با استفاده از آزمون $Pvalue=0/49$ Chi-Square، تفاوت معنی داری بین شکل کلینیکی غیر معمول در مبتلایان به *L.major* و *L.tropica* وجود نداشته است.

در بررسی جدول شماره ۳ عمده ضایعات اقماری، اسپوروتریکوئید، مزمن و وروکوز در دست و پا و ضایعات اریزپلونیید عمدتاً در صورت و گردن بوده‌اند ($Pvalue=0/04$) و تفاوت معنی داری محل ضایعات و

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.
3. اردهالی ص.، رضایی ح.ر.، ندیم الف. انگل لیشمانیا و لیشمانیوزها، لیشمانیوز پوستی، ۱۳۷۳، ص ۶۵-۴۷.
4. 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.
6. اصیلان، ع. لیشمانیوز جلدی و روش‌های درمانی و پیشگیری آن، ۱۳۷۱، ص ۴۸.
7. نصری فر، پ. تعیین گونه‌های انگل لیشمانیا پادتن‌های تک دودمانی در اصفهان. پایان نامه جهت اخذ کارشناسی ارشد علوم جانوری. ۱۳۷۸.
8. 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 Alimohammadian. 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.