مطالعه انگل‌شناسی و هیستوپاتولوژی لیشمانیوز احشائی در تعدادی از سگهای شهرستان مشکین شهر

● مهدی محبعلی، دانشیار دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
● مهناز بهمن‌رخ، استادیار دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران ● امیر حسام موسوی‌فر، دامپزشک آزاد

✓ پژوهش و سازندگی، شماره ۳۷، زمستان ۱۳۷۶

چکیده

دراین بررسی ۲۰ قلاده سگ مشکوک به لیشمانیوز احشایی کالبدگشایی شدندکه ۷ قلاده از آنها با استفاده از روش‌های انگل‌شناسی و آسیب‌شناسی مثبت شناخته شده و در طحال وکبد آنها جسم لیشمن مشاهده گردید. تغییرات هیستوپاتولوژی مشاهده شده شامل افزایش ماکروفاژهای حاوی‌اجسام لیشمن در طحال، کبد و غدد لنفاوی، افزایش سلولهای کوپفر کبد، دژنرسانس سلولهای کبدی، وجود سلولهای التهابی در کبد افزایش سلول‌های رتیکولواندوتلیال وکاهش لنفوسیت‌ها در طحال و غدد لنفاوی و هیپوپلازی پولپ سفید طحال بوده است. در نمونه طحال یکی از سگ‌های مبتلاکه در محیط‌های اختصاصی لیشمانیا کشت شده بود، پروماستیگوت دیده شدکه پس از تکثیر انبوه و انجام روش ایزوآنزیم، عامل بیماری *Leishmania infantum* LON 49 تعیین گردید.

مقدمه

لیشمانیوز احشایی شامل مجموعه‌ای از بیماریهایی است که توسط گونه‌های مختلف *Leishmania donovani* complex ایجاد می‌گردد. این گونه‌ها شامل *leishmania donovani* است که بیشتر در هندوستان، پاکستان، نپال و قسمت شرقی چین گسترش دارد.

Leishmania chagasi بیشتر در آمریکای جنوبی گسترش دارد. *Leishmania infantum* که باعث لیشمانیوز احشائی نوع مدیترانه‌ای می‌شود و در جنوب اروپا و تمامی کشورهای خاورمیانه از جمله ایران انتشار دارد. این بیماری تقریباً از تمامی استان‌های ایران گزارش شده است ولی در سه استان اردبیل (شهرستان‌های مشکین شهر و دشت مغان)، آذربایجان شرقی (شهرستان‌های کلیبر و اهر) و فارس (شهرستان‌های جهرم و فیروزآباد) به شکل اندمیک دیده می‌شود (۲). لیشمانیوز احشایی نوع مدیترانه‌ای جزء بیماری‌های تک یاختهای مشترک بین انسان و حیوانات به شمار می‌رود (۱). سگ، روباه و شغال مخازن اصلی این بیماری در ایران هستند (۵). به نظر می‌رسد سگ مهم‌ترین منبع آلودگی برای انسان خصوصاً در مناطق اندمیک به شمار رود (۲).

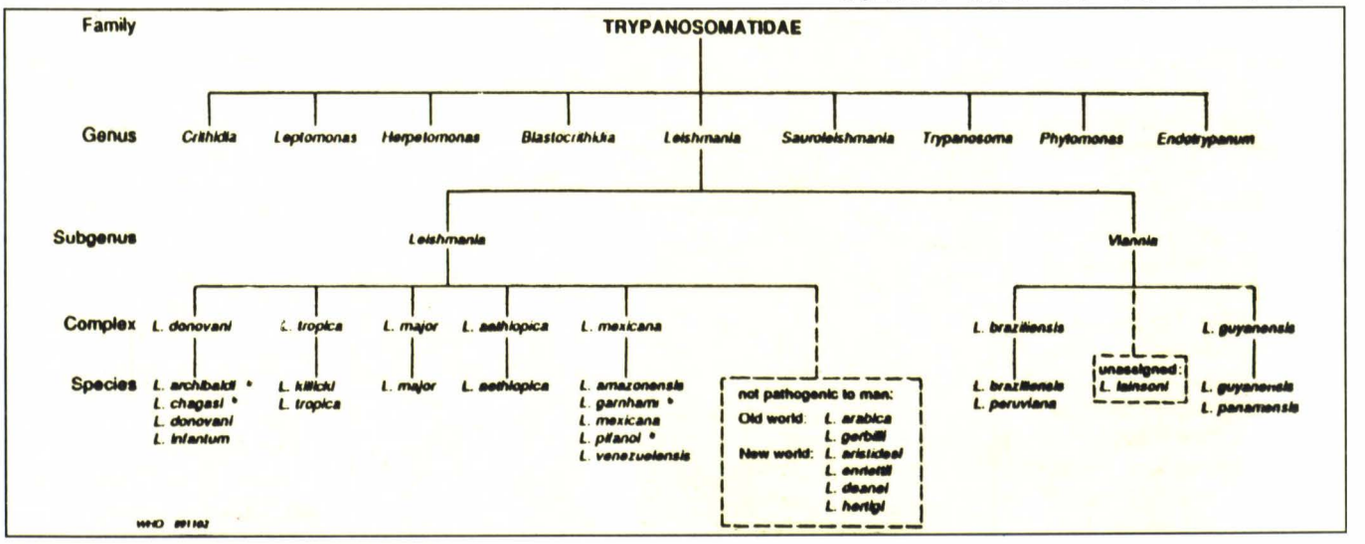
لیشمانیوز احشایی بوسیله پشهٔ خاکی از جنس فلبوتوموس از حیوانات مبتلا به انسان منتقل می‌گردد. ۹۸٪ موارد بیماری خصوصاً در مناطق اندمیک، در بچه‌های زیر ۹ سال دیده می‌شود. از سال ۱۳۲۸ تا سال ۱۳۷۲ بالغ بر ۴۳۰۰ مورد کالاآزار در انسان تشخیص داده شده و تحت درمان قرار گرفته‌اند (۳). در صورت عدم تشخیص به موقع و درمان مناسب، مرگ و میر این بیماری را تا ۹۰٪ تخمین می‌زنند. لذا این بیماری در انسان جزء بیماریهای کشنده‌وخطرناک‌به‌حساب می‌آید.

شناسایی و مبارزه با مخازن بیماری خصوصاً سگ‌های آلوده یکی از مهمترین راه‌های کنترل این بیماری برای انسان محسوب می‌گردد. از آنجایی که اکثر سگ‌های مبتلا فاقد علایم بالینی هستند، لذا آزمایشات انگل‌شناسی و مطالعات هیستوپاتولوژیک جهت شناسایی سگ‌های مبتلا بسیار مؤثرند و با تکیه بر آنها می‌توان سیر بیماری را تعیین نمود.

روش کار

از آنجایی که شهرستان مشکین شهر یکی از مناطق آلوده به لیشمانیوز احشایی به شمار می‌رود لذا این مطالعه در این شهرستان انجام گرفت. ابتدا روستاهایی که دارای موارد کالاآزار انسانی بودند

شمای شماره ۱- طبقه‌بندی لیشمانیا براساس گزارش سازمان جهانی بهداشت



شناسایی شده و با همکاری و مساعدت خانه‌های‌بهداشت هر منطقه، سگ‌هایی راکه دارای علائم بالینی مشکوک بودند و یا سابقه ابتلا به لیشمانیوز احشایی را داشتند پس از جلب رضایت صاحبانشان تحت بررسی قرار می‌گرفتند. در ابتدا حیوانات مشکوک از نظر علائم بالینی از قبیل لاغری، ریزش مو، وضعیت ناخن، کراتیت، لنفادنوپاتی و بزرگی شکم مورد معاینه قرار می‌گرفتند و سپس بوسیله نسدونال بیهوش شده و کالبدگشایی می‌شدند. (عکس‌های شماره ۱ و ۲).

پس از کالبدگشایی ابتدا تمامی تغییرات غیر طبیعی اندام‌ها ثبت شده و در صورت امکان مقداری از بافت‌های طحال و کبد در محیط اختصاصی اسلوپی اوانس تحت شرایط آسپتیک کشت می‌شدند. محیط‌های کشت به مدت یک ماه در دمای ۲۴-۱۸ درجه سانتیگراد نگهداری شده و هفته‌ای یک بار از نظر پروماستیگوت مورد مطالعه قرار می‌گرفتند. انگاه از کبد و طحال و غدد لنفاوی هر یک از حیوانات مورد بررسی، ۲ عدد گسترش تماسی بر روی لام میکروسکوپی تهیه می‌شد و پس از تثبیت با الکل متیلیک ۹۵٪ و رنگ آمیزی با گیمسا از نظر جسم لیشمن مورد بررسی قرار می‌گرفتند.

انگاه جهت مطالعات هیستوپاتولوژی قطعات کوچک حدود یک سانتی‌متری از طحال، کبد، کلیه، ریه، قلب، غدد لنفاوی مزانتریک و دیافراگم برداشت می‌گردید. این قطعات در فرمالین ۱۰٪ به میزان ۱۰ برابر حجم نمونه قرار داده شد و به آزمایشگاه پاتولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران ارسال می‌گردید. در این آزمایشگاه پس از آبگیری و آغشتگی به پارافین و قالب‌گیری، از بافت‌ها برش‌هایی تهیه می‌شد و سپس این برش‌ها به روی لام‌هاچسبانیده شده وبه روش‌های هماتوکسیلن ائوزین‌وگیمسا رنگ آمیزی می‌شدند و پس از چسبانیدن لامل از نظر رؤیت انگل و تغییرات بافتی مورد بررسی دقیق قرار می‌گرفتند.

نتایج

در این بررسی ۲۰ قلاده سگ در شهرستان مشکین شهر کالبدگشایی شدند که ۷ قلاده از آنها در مطالعات انگل‌شناسی و هیستوپاتولوژی مثبت بوده و در طحال، کبد و غدد لنفاوی مزانتریک آنها جسم لیشمن مشاهده گردید (شکل شماره ۳). ۴ قلاده از سگ‌های مبتلا دارای لنفادنوپاتی غدد پس زانویی[1]، ریزش مو و لاغری شدید بوده و بقیه فاقد هر نوع علائم بالینی بودند. در یکی از کشت‌های طحال به عمل آمده در محیط اختصاصی اسلوپی اوانس پس از یک هفته پروماستیگوت‌ها ظاهر شدند که پس از تکثیر انبوه به مدرسه بهداشت و طب گرمسیری دانشگاه لندن ارسال شده و با استفاده از روش ایزوآنزیم مورد آزمایش قرار گرفتند. پروماستیگوت‌های مذکور *L. infantum* LON 49 تعیین گردیدند. در هر ۷ قلاده سگ مبتلا به لیشمانیوز احشایی ضایعات هیستوپاتولوژیک با نتایج انگل‌شناسی کاملاً همخوانی داشته‌اند.

بحث و نتیجه‌گیری

لیشمانیوز احشایی نوع مدیترانه‌ای یکی از بیمارهای انگلی مشترک بین انسان و حیوانات است که در اکثر نقاط کشور دیده می‌شود. عامل این بیماری *L. infantum* است. سگ سانان وحشی مهم‌ترین مخازن حیوانی این بیماری در ایران به شمار می‌روند (۳) و سگ به عنوان مهم‌ترین منبع آلودگی در مناطق آندمیک این بیماری در ایران محسوب می‌گردد (۲).

تاکنون حدود ۹ بررسی مختلف در رابطه با وضعیت آلودگی سگ و سگ سانان به لیشمانیوز احشایی در ایران انجام شده است. اولین مطالعه توسط Neligan در سال ۱۲۹۱ (ه ش) بوده است نامبرده برای اولین مرتبه در اندام‌های داخلی یک سگ کالبدگشایی شده در تهران، جسم لیشمن را مشاهده نمود. سپس متعاقب آن مطالعات متعددی توسط محققین مختلف در نقاط کشور انجام شده و عامل بیماری در سگ‌های ولگرد، سگ‌های صاحب‌دار، روباه و شغال مشاهده گردید.

نکته مهم آنکه در تمامی این بررسی‌ها تنها به مشاهده جسم لیشمن در اندام‌های داخلی حیوان آلوده توجه شده و در هیچکدام از آنها جسم لیشمن از حیوان جدا نشده و مورد بررسی بیوشیمیایی قرار نگرفته است. لذا در این بررسی برای اولین مرتبه انگل لیشمانیا از حیوان مبتلا جدا شده و به روش ایزوآنزیم مورد بررسی قرار گرفته است که عامل بیماری در سگ *L. infantum* LON 49 تعیین شده و این سویه با سویه جدا شده از انسان توسط ادریسیان و همکاران (۲) کاملاً مشابه است، بنابراین به طور قطع می‌توان گفت که سگ‌ها یکی از مخازن لیشمانیوز احشایی برای انسان محسوب می‌گردند.

همانطور که در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شد تنها ۴ سگ از ۷ قلاده سگ مبتلا دارای علائم بالینی بوده‌اند و بقیه هیچگونه علامت بالینی خاصی را نشان

جدول شماره ۱- نتایج کالبدگشایی سگ‌های مشکوک به لیشمانیوز احشایی در شهرستان مشکین‌شهر

شماره	وجود یا عدم وجود علائم بالینی	وجود یا عدم وجود ضایعات ماکروسکوپی در کالبدگشایی	نتیجه آزمایش انگل‌شناسی	وجود عدم وجود تغییرات هیستوپاتولوژی
۱	+	+	+	+
۲	-	-	+	+
۳	-	-	-	-
۴	-	-	-	-
۵	-	-	-	-
۶	-	-	-	-
۷	+	+	+	+
۸	-	-	-	-
۹	+	+	+	+
۱۰	-	-	-	-
۱۱	-	-	-	-
۱۲	-	-	-	-
۱۳	-	-	-	-
۱۴	-	+	+	+
۱۵	-	-	-	-
۱۶	-	+	+	+
۱۷	+	+	+	+
۱۸	-	-	-	-
۱۹	-	-	-	-
۲۰	-	-	-	-
جمع	۴	۶	۷	۷

جدول شماره ۲- بررسی تغییرات هیستوپاتولوژی مشاهده شده در سگ‌های مبتلا به لیشمانیوز احشایی

اعضاءمبتلا	ضایعات	شماره سگ‌های مبتلا					
		۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷
طحال	وجود ماکروفاژهای حاوی اجسام لیشمن	+	+	+	+	+	+	+
	نکروز پولپ سفید	-	-	-	+	-	-	+
	پرخونی پولپ قرمز	+	+	+	+	+	+	+
	هیپرپلازی سلول‌های رتیکولوآندوتلیال	+	+	+	+	+	+	+
کبد	هیپرپلازی سلول‌های کوپفر	+	+	+	+	+	+	+
	حضور ماکروفاژهای حاوی اماستیگوت	+	+	+	+	+	+	+
	دژنرسانس سلول‌های کبدی	+	+	+	+	+	+	+
	حضور سلول‌های آماسی	+	+	+	+	+	+	+
غدد لنفاوی	هیپرپلازی سلول‌های رتیکولوآندوتلیال	+	+	+	+	+	+	+
	حضور اماستیگوت‌ها در قسمت مدولا	+	+	+	+	+	+	+
	حضور اماستیگوت‌ها در فولیکول‌های‌لنفاوی	+	+	+	+	+	+	+

عکس شماره ۱-
شکل ظاهری سگ مبتلا به لیشمانیوز احشایی

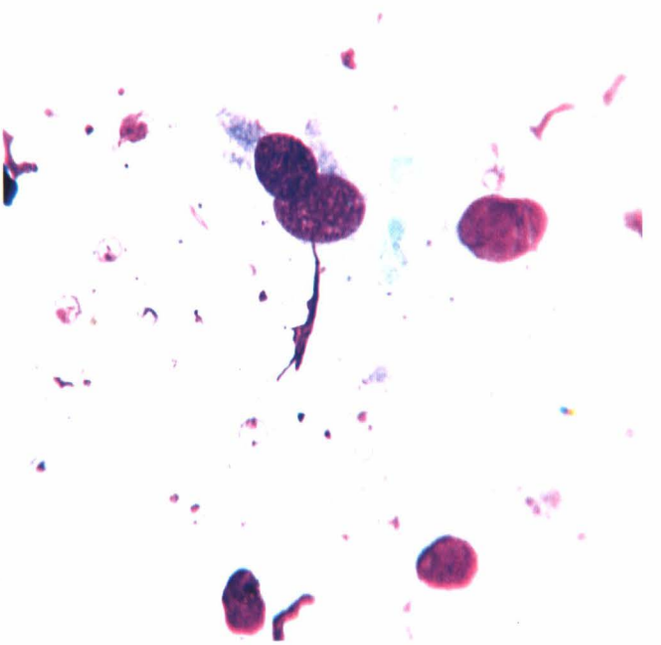
عکس شماره ۲- کالبدگشایی سگ مبتلا به لیشمانیوز احشایی با طحال بسیار بزرگ

نمی‌دادند. این موضوع با مطالعات سایر محققین همخوانی دارد. مبتلا در ۸۱ قلاده سگ که به طور تجربی در کشور ایتالیا به *L. infantum* آلوده شده بودند پس از حدود ۲ سال همگی از نظر انگل‌شناسی مثبت شدند ولی تنها ۴۵ قلاده (۵۵٪) دارای علائم بالینی خفیف و شدید بوده و ۳۶ قلاده (۴۵٪) دیگر هیچگونه علائم بالینی را نشان نمی‌دادند (۶). این موضوع از نظر اپیدمیولوژی و انتقال لیشمانیوز احشایی به انسان فوق‌العاده اهمیت دارد زیرا سگ‌های مبتلا و بدون علائم بالینی نیز قادر به انتقال عامل بیماری به انسان هستند (۸). لذا توصیه می‌شود در مناطق اندمیک لیشمانیوز احشایی در کشور، تمامی سگ‌های ولگرد را از بین برده و سگ‌های صاحب‌دار به وسیله آزمایشات سرولوژی (DAT, IFA و یا ELISA) مورد بررسی قرارگرفته و در صورت مثبت بودن هر یک از آزمایشات مذکور نسبت به معدوم نمودن آنها اقدامات لازم انجام پذیرد.

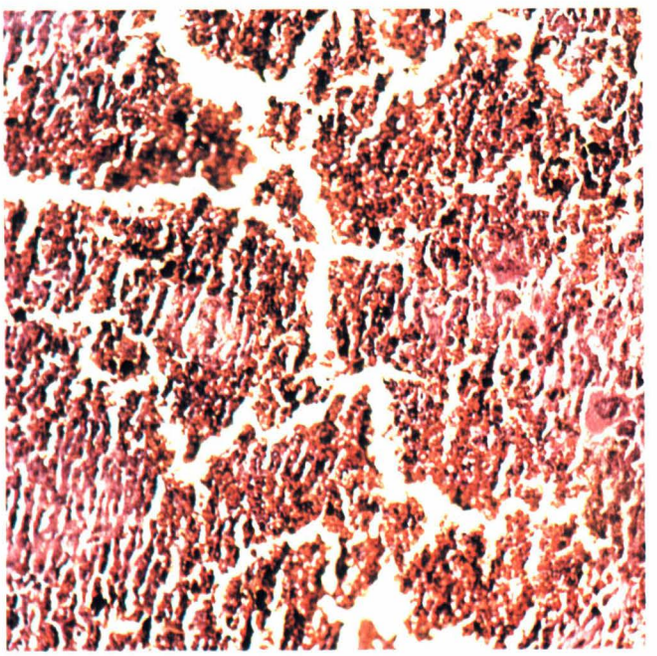
طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی (۹) مشاهده مستقیم انگل در بافت‌های سیستم رتیکولواندوتلیال یکی از روش‌های تشخیص لیشمانیوز احشایی به شمار می‌رود. میزان اطمینان این روش در نمونه‌های تهیه شده از طحال ۹۸٪، مغز استخوان ۸۶-۵۴٪، کبد ۶۰٪ و غدد لنفاوی ۶۴٪ است. در این تحقیق اساس تشخیص برآزمایش مستقیم گذاشته شد و از بافت‌های طحال، کبد و غدد لنفاوی، گسترش‌های تماسی تهیه شده و از نظر جسم لیشمن مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های حاوی ماکروفاژهای آلوده به جسم لیشمن به عنوان نمونه‌های مثبت تلقی می‌شدند و مطالعات هیستوپاتولوژی در مورد آنها به عمل می‌آمد. نمونه‌هایی که فاقد هر گونه جسم لیشمن بودند به عنوان منفی تلقی می‌شدند. از میان ۲۰ قلاده سگ کالبدگشایی شده ۷ قلاده (۳۵٪) از نظر لیشمانیوز احشایی مثبت بودند. در گسترش‌های هیستولوژی تهیه شده از تمامی سگ‌های مثبت، تغییرات بافتی مشاهده گردید. این به دلیل آن است که این گسترش‌ها از بافت‌های کبد و طحالی تهیه شده بودند که قبلاً از آنها گسترش‌های تماسی تهیه شده بود. از آنجایی که گسترش‌های بافتی تهیه شده از مراحل مختلف آبگیری، شفاف‌سازی، آغشتگی به پارافین و غیره می‌گذشتند. لذا مراحل فوق اکثراً به انگل‌ها آسیب وارد نموده و دیواره آنها از بین می‌رفتند و تعداد اجسام لیشمن که در این گسترش‌ها دیده می‌شوند نسبت به گسترش‌های تماسی کمتر بوده و از وضوح کمتری برخوردار بودند. لذا چنین نتیجه می‌شود که مطالعات هیستوپاتولوژی جهت مطالعه تغییرات و روند بیماری در بافت‌ها مناسبند ولی گسترش‌های تماسی جهت جستجوی جسم لیشمن بر گسترش‌های هیستولوژیک ترجیح دارند.

در رنگ‌آمیزی بافتی نیز گسترش‌هایی که با گیمسا رنگ آمیزی شدند به مراتب از آنهایی که با هماتوکسیلن ائوزین رنگ‌آمیزی شده بودند واضح‌تر و کامل‌تر بودند و اجسام لیشمن بهتری در آنها دیده می‌شدند. این موضوع شاید به این دلیل باشد که رنگ‌آمیزی هماتوکسیلن - ائوزین یک روش عمومی رنگ‌آمیزی است و برای

عکس شماره ۳- اجسام لیشمن در داخل و خارج ماکروفاژها



عکس شماره ۴- هیپوپلازی، از دست دادن نظم و اتصال پولپ‌های سفید و پرخونی و احتقان پولپ قرمز طحال (H & E ×۸۰۰)



تغییرات بافتی بسیار مناسب است و اختصاص به انگل و یا میکروارگانیزم خاصی ندارد در حالی که رنگ‌آمیزی گیمسا برای میکروارگانیزم‌ها خصوصاً اجسام لیشمن اختصاصی است و با این روش اجسام لیشمن بهتر دیده می‌شوند.

چنانچه در جدول شماره ۲ مشاهده می‌شود تغییرات هیستوپاتولوژیک در طحال، کبد و غدد لنفاوی به شکل وسیعی دیده شده است که با مطالعات Meleny و همکاران (۷) همخوانی دارند. طبق گزارش Ferrer (۴) ماکروفاژهای حاوی آماستیگوت ممکن است در بافت بینابینی کلیه‌ها، قلب، ریه‌ها، غدد آدرنال، چشم و بیضه‌ها حضور پیدا کنند. در این بررسی اصولاً در بافت‌های مذکور هیچگونه ماکروفاژ حاوی اجسام لیشمان یا تغییر بافت شناسی خاصی (به غیر از کلیه‌ها) مشاهده نشد. به نظر می‌رسد که حضور ماکروفاژهای حاوی اماستیگوت در این بافت‌ها به طور اتفاقی بوده و نیز تعداد آنها بسیار اندک بوده است. زیرا وظیفه سیستم رتیکولواندوتلیال است که این ماکروفاژها را از خون بگیرد و منهدم نماید لذا ماکروفاژهای آلوده به طور اتفاقی وارد می‌شوند که آن نیز به شدت بیماری بستگی دارد. در این مطالعه فقط یک نمونه گسترده رسوب هیالن در لوله‌های ادراری، گلومرولونفریت غشایی و دژنرسانس سلول‌های پوششی توبول‌های مجاور گلومرولی دیده شد.

گلومرولونفریت غشایی اکثراً در اثر واکنش‌هایی با سیستم ایمنی تولید می‌شود و نمی‌توان آن را به طور قطع مربوط به لیشمانیا دانست. در اثر گلومرولونفریت غشایی پروتئین‌ها به طور غیر انتخابی دفع می‌شوند و چون دژنرسانس توبول‌های کلیوی وجود دارد پروتئین‌ها جذب آب میان بافتی نشده و باعث ایجاد رسوب‌های هیالینی در توبول‌های کلیوی می‌شوند.

سپاسگزاری

بدین وسیله از همکاری‌های مرکز آموزش و تحقیقات بهداشتی شهرستان مشکین شهر، شبکه بهداشت و درمان شهرستان مشکین شهر به خصوص آقایان شیردل، قربانی و آقا محمدی جهت اجرای این پژوهش، آقای عبدالصمد مطلومی جهت انجام ایزوآتریم و سرکار خانم هماحجاران به منظور همکاری جهت نگهداری لیشمانیای جدا شده، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

پاورقی‌ها

1- Sloppy Evans
2- Popliteal

منابع مورد استفاده

۱ محبعلی،مهدی ۱۳۷۵.بیماری‌های تک‌یاخته‌ای مشترک‌بین انسان و حیوانات، جلد اول، چاپ اول، انتشارات نادی، صفحات ۸۶-۳۱.

2- Edrissian Gh., H., 1990. Kala-azar in Iran. Med. J. Islamic. Rep. Iran. 3: 235-237.

3- Edrissian Gh., H., 1996. Visceral leishmaniasis in Iran and the role of serological tests in diagnosis and epidemiological studies. In: M. Ali Ozcel and M. Zia Alkan parasitology for 21st century. CAB international, 63-76.

4- Ferrer L., Rabanal R.M., 1988. Identification of *Leishmania donovani* amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining. Res. Vet. Sci.

5- Hamidi A.M., Nadim A., Edrissian Gh.H., 1982. Visceral leishmaniasis of jackals and dogs in northern Iran. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 79: 756-757.

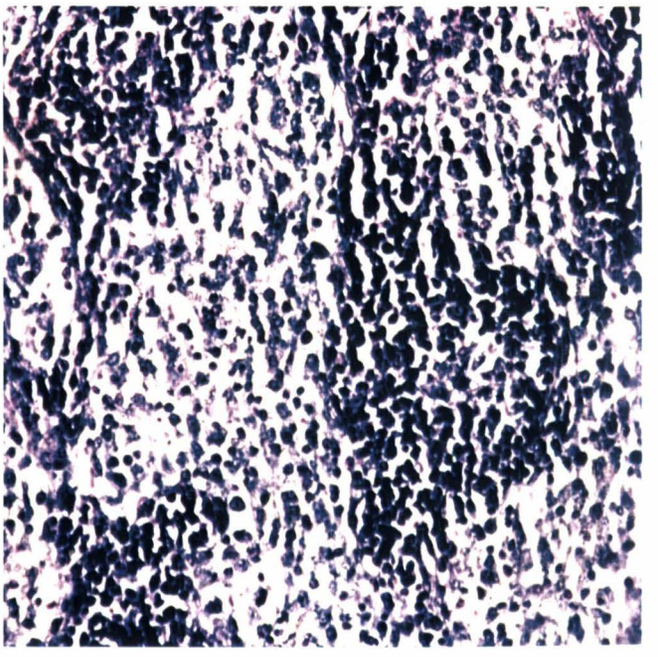
6- Mancini F., 1988. Studies on canine leishmaniasis control 1- evaluation of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.

7- Meleny H.E., 1995. Kala - azar in the hamster, monkey and man. Am. J. Path 1: 147.

8- Tesh R., 1995. Control of zoonotic visceral leishmaniasis is it time to change strategies: Am. J. Trop. Med. Hyg. 52: 287-292.

9- World Health Organization, 1993. Basic laboratory method in medical parasitology. 58-61.

عکس شماره ۵ - حضور سلولهای هیستوسیت در قسمت مدولای غدد لنفاوی (گیمسا ۴۰۰ ×)



عکس شماره ۶ هیپوپلازی کوپفرسل‌ها، دژنره واکوئله شدن سلول‌های کبدی (گیمسا ۲۰۰ ×)