

تشخیص حضور فعال انگل توکسوپلازما گوندیی در اندامهای مختلف بدن رت پس از آلودگی تجربی با سویه RH

فرشته زارع^۱، عبدالحسین دلیمی اصل^{۲*}، فاطمه غفاری فر^۳

۱- کارشناسی ارشد انگل شناسی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استاد انگل شناسی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استادیار انگل شناسی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

هدف: توکسوپلازما گوندیی تک یاخته‌ای کوکسیدیایی است که در بافتهای مختلف بدن رت آلوده به صورت کیست نسجی یافت می‌شود. هدف از این مطالعه، بررسی حضور فعال انگل در بافتهای مختلف رت آلوده شده با سویه RH از طریق تلقیح به موش بوده است.

مواد و روش کار: در این مطالعه تجربی- مداخله‌ای در مجموع تعداد ۷۵ رت و ۵۰۰ موش سوری استفاده شدند. ابتدا با تزریق طریق داخل صفاقی ۴۰ تا ۵۰ هزار تاکی زوایت همه رت‌ها آلوده شدند. ۱۲ ساعت پس از شروع آلوده‌سازی، نمونه‌برداری آغاز شد و تا ۳ روز هر ۲۴ ساعت و پس از آن هر سه روز یک بار تا ۶۰ روز هر بار تعدادی رت را کشته و اندامهایی از قبیل طحال، کبد، قلب، عضلات مخطط، کلیه و مغز آنها جدا شد و پس از له کردن بافتها به همراه سرم فیزیولوژی و آنتی‌بیوتیک به موش سوری تزریق شد.

نتایج: در این بررسی مشخص شد کیست انگل از روز پنجم تا روز شصتم (مدت زمان تحقیق) در مغز و از روز نهم تا شصتم در دو بافت عضله و قلب و از روز پنجم تا دوازدهم در طحال و تا بیست و هفتم در کبد حضور دارد. در بافت کلیه، طی شصت روز هیچ انگلی مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: انگل توکسوپلازما در اندامهایی مانند طحال و کبد برای مدت کوتاه، ولی در مغز و عضلات برای مدت طولانی می‌تواند حضور یابد. اندامهایی مانند کلیه، محل مناسبی برای استقرار انگل نیستند.

کلید واژگان: توکسوپلازما گوندیی، رت، اندامهای مختلف.

۱- مقدمه

عوارض و علایم بیماری عمدتاً در مرحله حاد بروز می‌کند و در پی آن با فعال شدن سیستم ایمنی میزبان تکثیر انگل کنترل و کیستهای نسجی در بافتهای میزبان تشکیل می‌شود [۱].

اگرچه توکسو پلاسموزیس اکتسابی در افراد دارای سیستم ایمنی سالم بیماری خفیف یا بدون علایمی را ایجاد می‌کند، ولی در افراد با اختلال سیستم ایمنی عوارض و علایم شدید و حتی

توکسوپلازما گوندیی^۱ تک یاخته‌ای از خانواده کوکسیدیا^۲ است که انگل اجباری درون سلولی انسان و حیوانات می‌باشد. میزبان نهایی آن گربه است و در تعداد بی‌شماری از پستانداران و پرندگان بیماری ایجاد می‌کند. به طور کلی انسان از دو راه اکتسابی و مادرزادی به توکسوپلاسموزیس مبتلا می‌شود. سیر بیماری در بدن انسان شامل دو مرحله حاد و مزمن می‌باشد.

* نشانی مکاتبه: تهران، تقاطع بزرگراه جلال آل احمد و شهید چمران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی. تلفن: ۸۸۰۱۱۰۰۱، دورنگار: ۸۸۰۱۳۰۳۰

E-mail: dalimi4@yahoo.com

1. *Toxoplasma gondii*
2. *Coccidia*

روش Dye test از لحاظ آلودگی به توکسوپلازما گوندیی مورد آزمایش قرار گرفتند و همه موارد مثبت از مطالعه حذف شدند.

۲-۲- تهیه و تکثیر تاکی زوایت

سوش استاندارد RH توکسوپلازما گوندی نگهداری شده در گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس را با پاساژ متوالی در حفره صفاقی سوری به تعداد کافی تکثیر داده شد. [۳]

۲-۳- آلوده کردن رت‌ها

پس از جمع‌آوری مقدار کافی انگل، همزمان ۷۵ رت مورد آزمایش ابتدا در گروه‌های سه تایی تقسیم شده و با تزریق ۴۰ تا ۵۰ هزار تاکی زوایت در حجم یک میلی لیتر به صورت داخل صفاقی آلوده شدند [۳].

۲-۴- نمونه برداری از اندامها

نمونه برداری ۱۲ ساعت پس از تزریق انگل و سپس تا ۳ روز هر ۲۴ ساعت و سپس هر سه روز یک بار تا مدت ۶۰ روز صورت گرفت. در هر مرحله از نمونه‌گیری یک گروه سه تایی از رت‌ها را کشته و اندامهایی از قبیل طحال، کبد، قلب، عضلات مخطط، کلیه و مغز آنها جداسازی شدند.

۲-۵- تهیه نمونه و تلقیح به موش سوری

پس از کشتن رت‌ها با کلروفورم قفسه سینه آنها را باز کرده، با آنژیوکت سرم فیزیولوژی را از بطن چپ وارد آئورت نموده، سپس تمام خون از رگ تخلیه می‌شد. پس از انفوزیون، اندامهای مختلف در پلیت‌های جداگانه جمع‌آوری و چندین بار با سرم فیزیولوژی شستشو شدند. سپس با استفاده از تیغه بیستوری هر اندام را تکه تکه نموده و درهاون مخصوص کاملاً له و همگن کردیم. دو بافت عضله مخطط و قلب به دو صورت هضم شده در آنزیم پپسین و یا هضم نشده تهیه شدند. اندامها پس از له شدن در سرم فیزیولوژی، حل و آنتی‌بیوتیکهای استریپتومایسین و پنی‌سیلین به اندازه ۱۰۰ میلی گرم برای هر سانتیمتر مکعب به آن اضافه و آماده تزریق شدند. هر اندام به سه موش سوری به میزان ۱/۵ سی سی به صورت داخل صفاقی تزریق گردید [۳].

۲-۶- بررسی موشهای سوری

در طول ده روز پس از شروع آلودگی علائم بیماری مانند بی‌اشتهایی، لاغری، خواب‌آلودگی، ژولیدگی موها و کز کردن در موشهای آلوده، ظاهر شد. در طول این مدت از روز چهارم به

مرگ را باعث می‌شود. از طرفی در افرادی که به نقص سیستم ایمنی دچار می‌شوند و یا داروهای سرکوب کننده پاسخهای ایمنی را مصرف می‌کنند آلودگی مزمن ممکن است مجدداً فعال شده عوارض شدید و کشنده‌ای مانند آنسفالیت میوکاردیت و پنومونی ایجاد نماید. تضعیف سیستم ایمنی معمولاً به بروز عوارض شدیدتری از توکسوپلاسموزیس به خصوص در دریافت کنندگان پیوند منجر می‌شود. حدود ۳۰ درصد موارد مرگ و میر مبتلایان به ایدز در اثر توکسوپلاسموزیس بوده و یکی از علل مرگ و میر در این گونه بیماران آنسفالیت توکسوپلاسمایی گزارش شده است [۱]. آلودگی به این تک‌یاخته از سراسر دنیا گزارش شده است. این انگل علاوه بر انسان تعداد زیادی از حیوانات پستاندار و همچنین گونه‌های مختلف پرندگان را آلوده کرده و قادر است در طیف وسیعی از سلولهای میزبان تکثیر یابد، انگل به سه شکل تاکی زوایت، اوسیست و کیست نسجی می‌باشد. در مرحله حاد بیماری تاکی زوایت‌ها هر ۴ تا ۶ ساعت یکبار در سلول میزبان تکثیر یافته و هنگامی که سیتوپلاسم انباشته از تاکی زوایت گردد، پاره می‌شود، سپس انگلهای آزاد شده به سلولهای مجاور حمله می‌کنند این عمل باعث تحریک سیستم ایمنی بدن می‌شود در نتیجه فعال شدن سیستم ایمنی بدن، انگل فرار کرده به بافتهای مختلف بدن مهاجرت می‌کند و در آنجا کیست نسجی ایجاد می‌کند [۲،۳]. اگر چه اندامهای مستعد آلودگی به انگل توکسوپلازما شناسایی شده‌اند؛ ولی تاکنون در زمینه زمان شروع، حضور و مدت زمان حضور انگل در یک اندام خاص مطالعه چندانی صورت نگرفته است. تنها تحقیق صورت گرفته در این زمینه مربوط به مطالعه شریفیان (۱۳۸۳) با استفاده از روش مولکولی است [۴]. سؤال اصلی مطالعه حاضر این است که پس از آلودگی تجربی رت با سویه RH توکسوپلازما گوندیی^۱، انگل در کدام اندام آنها و تا چه مدت مستقر می‌شود. پاسخ این سؤال، ما را در شناخت بهتر چرخه زندگی انگل و سیر حرکت آن در بدن میزبان یاری می‌کند.

۲- مواد و روش کار

۲-۱- تولید رت‌ها و سوره‌های عاری از آلودگی

توکسوپلاسمایی

ابتدا ۷۵ موش صحرائی سفید آزمایشگاهی (رت) و ۵۰۰ موش کوچک سفید آزمایشگاهی (سوری) خالص نشده^۲ هم سن و هم جنس در شرایط کنترل شده از نظر غذا و پوشال اتوکلاو شده تکثیر و نگهداری شدند. همه رت‌ها پیش از شروع تحقیق با

1. Toxoplasma gondii (RH strain)
2. Out breed

روز نهم ظاهر و تا پایان مدت (۶۰ روز) قابل مشاهده بود. در بافت کبد نیز از روز ششم ظاهر و تا روز ۲۷ قابل مشاهده بود. در بافت طحال از روز ششم تا روز ۱۲ قابل مشاهده بود. در بافت کلیه نیز، هیچ کیستی در طول ۶۰ روز مشاهده نشد.

جدول ۲ نشانگر روند بقای موشهای سوری پس از تلقیح اندام رت‌های آلوده به آنهاست، طبق اطلاعات این جدول از روز ششم آلوده‌سازی، انگل در مغز، کبد و طحال و از روز نهم در عضلات مخطط و قلب رت‌ها حضور داشته، به طوری که در اثر تلقیح این اندامها به موش، کلیه موشها در اثر آلودگی به توکسوپلازما تلف شدند. از روز دوازدهم آلوده‌سازی، انگل از طحال و از روز بیست و هفتم از کبد خارج شد، به طوری که پس از مدت مذکور در اثر تلقیح این اندامها به موش، کلیه موشها زنده باقی ماندند؛ ولی حضور انگل در عضلات مخطط و قلب رت‌ها همچنان تا روز شصتم، ادامه داشت.

بعد، هر روز از همه حیوانات تحت مطالعه، مایع صفاقی برداشت و سپس رسوب حاصله مستقیم در زیر میکروسکوپ بررسی می‌شد. در موارد مشکوک برای اطمینان بیشتر لام را با گیمسا^۱ رنگ‌آمیزی کرده، سپس بررسی صورت می‌گرفت [۳].

۳- نتایج

در این مطالعه روند حضور توکسوپلازما در بافتهای مغز، کلیه، کبد، طحال و عضلات رت در خلال آلودگی تجربی به سویه RH توکسوپلازماگوندی با روش تشخیصی تلقیح به موش انجام شد، که نتایج آن به شرح زیر است.

در جدول ۱، نشانگر حضور (+) یا عدم حضور (-) توکسوپلازما گوندی در اعضا و اندامهای مختلف رت بر حسب روز پس از آلوده‌سازی است. طبق این جدول، کیست انگل در بافت مغز از روز ششم آلودگی و در بافت قلب و عضلات از

جدول ۱ حضور (+) یا عدم حضور (-) توکسوپلازما گوندی در اعضا و اندامهای مختلف رت بر حسب روز پس از آلوده‌سازی

حضور (+) یا عدم حضور (-) انگل در						زمان پس از آلوده‌سازی رت (روز)
کلیه	قلب	عضله	طحال	کبد	مغز	
-	-	-	-	-	-	۱
-	-	-	-	-	-	۲
-	-	-	-	-	-	۳
-	-	-	+	+	+	۶
-	+	+	+	+	+	۹
-	+	+	+	+	+	۱۲
-	+	+	-	+	+	۱۵
-	+	+	-	+	+	۱۸
-	+	+	-	+	+	۲۱
-	+	+	-	+	+	۲۴
-	+	+	-	+	+	۲۷
-	+	+	-	-	+	۳۰
-	+	+	-	-	+	۳۳
-	+	+	-	-	+	۳۶
-	+	+	-	-	+	۳۹
-	+	+	-	-	+	۴۲
-	+	+	-	-	+	۴۵
-	+	+	-	-	+	۴۸
-	+	+	-	-	+	۵۱
-	+	+	-	-	+	۵۴
-	+	+	-	-	+	۵۷
-	+	+	-	-	+	۶۰

1. Giemsa stain

جدول ۲. روند بقای موشهای سوری پس از تلقیح اندام رت‌های آلوده به توکسوپلازما گوندی بر حسب زمان پس از آلوده‌سازی رت‌ها

درصد زنده ماندن موشهای سوری تا ۶۰ روز پس از تلقیح					زمان پس از آلوده‌سازی رت (روز)
کلیه رت	طحال رت	کبد رت	عضلات و قلب	مغز رت	
۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱
۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۳
۱۰۰	۰	۰	۱۰۰	۰	۶
۱۰۰	۰	۰	۰	۰	۹
۱۰۰	۱۰۰	۰	۰	۰	۱۲
۱۰۰	۱۰۰	۰	۰	۰	۱۵
۱۰۰	۱۰۰	۰	۰	۰	۱۸
۱۰۰	۱۰۰	۰	۰	۰	۲۱
۱۰۰	۱۰۰	۰	۰	۰	۲۴
۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۰	۰	۲۷
۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۰	۰	۳۰
۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۰	۰	۶۰

۴- بحث

برای مطالعه حضور انگل در بافت تاکنون از روشهای مختلفی استفاده شده است. این روشها شامل روش تلقیح بافت آلوده به موش سوری، روشهای کشت سلولی، هیستوپاتولوژی^۱، سرولوژیکی^۲ و PCR^۳ است. مزایای روش تلقیح بافت به موش سوری، این است که این روش، بسیار حساس، ساده، ارزان، مناسب و فاقد موارد مثبت کاذب می‌باشد. در ضمن در این روش می‌توان انگل زنده و فعال را در بافت تشخیص داد. از معایب این روش، این است که علاوه بر وجود خطر انتقال آلودگی به شخص آزمایش کننده، برای تشخیص آلودگی حداقل به ده روز وقت نیاز است [۵]. در مطالعه حاضر با استفاده از این روش حضور انگل زنده توکسوپلازما در اندامهای مختلف رت بررسی شد. طبق نتایج به دست آمده از این مطالعه انگل توکسوپلازما می‌تواند در اوایل بیماری در اندامهایی مانند طحال و کبد حضور یابد. چون تلقیح انگل به موش به صورت داخل صفاقی صورت گرفته بود قاعدتاً ابتدا اندامهای همجوار مانند کبد و طحال به انگل آلوده می‌شوند، سپس احتمالاً با فعال شدن سیستم ایمنی میزبان، انگل از طحال خارج شده و به محل دیگری مهاجرت کرده و یا از بین رفته است. از روز پنجم آلوده‌سازی، انگل در کبد ظاهر گردید و تا مدت ۲۷ روز در کبد باقی ماند. در سه

بافت مغز، قلب و عضله، انگل تا ۶۰ روز پس از آلودگی (پایان مطالعه) همچنان حضور داشت و ممکن است تا پایان عمر میزبان به حضور خود در این بافتها ادامه دهد. در بافت کلیه، انگلی مشاهده نشد؛ اصولاً بافت کلیه بافت مناسبی برای رشد توکسوپلازما نیست.

روش PCR روشی سریع و حساس برای تشخیص توکسوپلازما گوندی در آزمایشگاه است. شریفیان (۱۳۸۳) مطالعه‌ای در این زمینه با استفاده از روش مولکولی انجام داده است [۴]. نتایج مطالعه شریفیان مؤید نتایج مطالعه حاضر است، بدین معنی که هر دو روش تلقیح انگل به موش و روش مولکولی به صورت یکسان حضور فعال انگل در اندامهای مختلف را نشان دادند. از معایب روش مولکولی گران بودن و عدم دسترسی آن در همه آزمایشگاههاست. در این روش انگل زنده و مرده را نمی‌توان از هم تشخیص داد و در تکثیر DNA به نمونه‌های شاهد مثبت و منفی و استفاده از پرایمر^۴ مناسب نیاز می‌باشد [۵-۸].

کشت سلولی روش دیگری برای تشخیص آلودگی بافتی به توکسوپلازما گوندی است. حساسیت روش کشت سلولی نسبت به روش تلقیح به موش و PCR کمتر است به طوری که در روش PCR حتی حضور یک انگل را می‌توان نشان داد؛ ولی در کشت سلولی حضور حداقل ده انگل ضروری است [۹،۵]. در روشهای سرولوژیکی معمولاً میزان آنتی‌بادی موجود در سرم یا دیگر مایعات با تکنیک‌های متفاوت اندازه‌گیری می‌شود. به

1. Histopathology
2. Serological
3. Polymerase Chain Reaction

4. Primer

بافت تشکیل نشده باشد، جواب منفی کاذب به دست می‌آید. علاوه بر این مشخص شده که حساسیت آن از تلقیح انگل به موش و PCR کمتر است [۱۱، ۱۲].

به طور کلی روش تلقیح انگل به موش همانند روش PCR در تعیین محل دقیق آلودگی به توکسوپلازما در بدن دارای کارایی بالایی می‌باشد. طبق نتایج این مطالعه، انگل توکسوپلازما در اندامهایی مانند طحال و کبد برای مدت کوتاه، ولی در مغز و عضلات مخطط و قلب برای مدت طولانی می‌تواند حضور فعال داشته باشد و اندامهایی مانند کلیه، محل مناسبی برای استقرار انگل به حساب نمی‌آید.

دلیل حساسیت و ویژگی متفاوت روشها، ارزش تشخیصی آنها نیز با یکدیگر متفاوت است. اگر چه انجام روشهای سرولوژیکی نسبت به روشهای دیگر راحت تر است؛ ولی مشکل تفسیر جوابهای سرولوژیکی همیشه مطرح بوده است. در ضمن جوابهای سرولوژیکی در مرحله حاد بیماری یا در افراد با نقص سیستم ایمنی نمی‌تواند جوابهای صحیحی به ما بدهد [۱۰]. علاوه بر این روش سرولوژی فقط وجود و یا نبود آلودگی را نشان می‌دهد و از تعیین محل دقیق آلودگی در بدن عاجز است. روش مطالعه مقاطع بافتی نیز یک روش مناسب برای مشاهده تاکی زوئیت، کیست‌های کاذب و حقیقی به شمار می‌آید. ولی اگر تراکم انگل در بافت کم باشد یا هنوز کیست در

۵- منابع

- [۱] صائی، ا. بیماریهای انگلی در ایران، چاپ ششم، تهران. انتشارات حیان، ۱۳۷۷، ۱۲۳-۲۴۷
- [۲] چین، ج. دستور کار کنترل بیماری‌های واگیردار در انسان، صباغیان، حسین، چاپ اول، تهران، انتشارات پورسینا، ۱۳۸۰، ۶۹۶-۷۰۱.
- [۳] دویی، ج. توکسوپلاسموزیس در انسان و حیوانات ترجمه اسماعیل ذوقی. ج ۱، دفتر نشر فرهنگ اسلامی، ۱۳۷۲.
- [۴] شریفیان، م. مطالعه سیر حرکت انگل توکسوپلازما گونده‌ای در رت با روش PCR و RT-PCR. پایان نامه برای دریافت دکترای تخصصی انگل شناسی از دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، ۱۳۸۳.
- [5] Da Silva AV and Langoni H. The detection of *Toxoplasma gondii* by comparing cytology, histopathology, bioassay in mice, and the polymerase chain reaction (PCR). *Vet Parasitol*, 2001; 97: 191-198.
- [6] Hohlfeld P, Daffos F, Costa JM, Thulliez P, Forestier F, Vidaud M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase chain reaction test on amniotic fluid. *New Eng J Med*, 1994; 331: 695-699.
- [7] Pelloux H, Dupouy-Camet J, Derouin F, Aboulker JP, Raffi F. A multicenter prospective study for the polymerase chain reaction detection of *Toxoplasma gondii* DNA in blood samples from 186 AIDS patients with suspected toxoplasmic encephalitis. *AIDS*, 1997; 11: 1888-1890.
- [8] Bastien P. Molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Trans R Soc Trop Med Hygiene*, 2002; 96: S205-215.
- [9] Derouin F & Garin YJ. Isolation *Toxoplasma gondii* by cellular in HIV infected patients. *Presse Med*. 1992; 921: 1853-1856 (In French).
- [10] Estiban Redondo I, Innes EA. Detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of sheep orally challenged with different doses oocysts. *Int J Parasitol*, 1998; 28: 1459-1466.
- [11] Desmonts G, Daffos F, Forestier F, Capella-Pavlovsky M, Thulliez P, Chartier M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Lancet*, 1985; 500-504.
- [12] Pereira-Bueno J, Quintanilla-Gozaolo A, Perez-Perez V. Evaluation of ovine abortion associated with *Toxoplasma gondii* in Spain by different diagnostic techniques. *Vet Parasitol*, 2004; 1-10.