# تاثیر گروههای خونی انسان بر رشد عامل لیشمانیوز

دکتر غلامرضا والی * ، دکتر صفرعلی طالاری **


## خلاصه

**سابقه و هدف:** با توجه به شیوع لیشمانیوز در کشور و اهمیت شناخت ، تشخیص و درمان بیماری و مشکلات و هزینه محیط کشت انگل از خون خرگوش و به منظور تعیین تاثیر گروههای خونی انسان بر رشد عامل لیشمانیوز و مقایسه آن با محیط محتوی خون خرگوش ، این تحقیق طی سال ۱۳۷۴ در کاشان انجام گرفت.

**مواد و روشها:** پژوهش حاضر با روش تجربی (Experimental) بر روی پروماستیگوت L.Major ، L.Tropica و L.Infantum مورد تایید سازمان جهانی بهداشت ، در محیط کشت محتوی خون خرگوش و محیط‌های ۸گانه خون انسان با ۴ تکرار صورت پذیرفت. زمان سازگاری با محیط ، حداکثر رشد و حداقل رشد بر مبنای کاهش تعداد انگل فعال از تعداد انگل از زمان کشت محاسبه و مورد قضاوت آماری قرار گرفت.

**یافته‌ها:** سرعت زمان سازگاری محیط‌ها با هم مساوی و ۱ تا ۲ روز بوده ، محتوی خون انسانی در زمان کوتاه‌تر از خون خرگوش به حداکثر رشد رسیدند و حداقل تعداد رشد در خون خرگوش بیشتر از گروه خون انسان بود. میزان رشد تعداد انگل در خون خرگوش در سه نوع انگل بیشتر از گروه خونی انسان بود ($P<0/05$) و در گروه‌های خونی RH منفی بیشتر از RH مثبت و در گروه خونی B بیشتر از سایر گروه‌های خونی بود.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به اهمیت سرعت زمان رشد انگل ، گروه‌های خون انسانی قادر به جایگزینی با خون خرگوش می‌باشد ، انجام تحقیق بر روی نمونه‌های انسانی توصیه می‌گردد.


**واژگان کلیدی :** گروه‌های خونی ، لیشمانیوز ، پروماستیگوت

* دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی کاشان ، گروه بیوشیمی

** دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی کاشان ، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی

## مقدمه

لیشمانیوز یکی از بیماری‌های زئونوز انگلی است که با عوامل مختلف لیشمانیا L.Major ، L.Tropica و L.Infantum بروز می‌کند. در سال ۱۸۸۵ Cuningham اولین فردی بود که وجود تک یاخته انگلی را از زخم‌های جلدی گزارش و در سال ۱۹۰۰، Leishman در طحال فرد مبتلا، اجسام کوچک بیضی شکلی را جدا کرد که بعداً به نام Leishman نام گذاری شد (۱). در سال ۱۹۰۴ برای اولین بار Rogers موفق به کشت انگل و مشاهده شکل تاژک‌دار آن در محیط کشت حاوی خون خرگوش گردید که در سال ۱۹۰۸ توسط Nicolle به نام محیط NNN معروف شد و امروزه در اکثر آزمایشگاههای تحقیقاتی به کار می‌رود (۲). در جهان بیش از ۳۵۰ میلیون نفر به لیشمانیوز مبتلا هستند و تعداد مبتلایان به لیشمانیوز جلدی به ۱۲ میلیون نفر تخمین زده می‌شود، میزان آلودگی در ایران ۱۶۰۰۰ نفر می‌باشد که میزان واقعی آن بیش از ۳ برابر آمار گزارش گردیده است (۳). با توجه به شیوع لیشمانیوز، اهمیت شناخت، تشخیص به موقع و مبارزه با آن که از اولویت‌های پژوهشی می‌باشد و اشکال نادر بیماری که به فرم‌های مختلف تظاهر می‌نماید، تنها از طریق کشت انگل میسر است و به همین جهت ضروری می‌باشد برای تهیه محیط‌های کشت مناسب ، مطالعات و تحقیقات گسترش یابند. در حال حاضر ، برای تهیه محیط کشت لیشمن از خون خرگوش استفاده می‌شود (۴). تهیه خون خرگوش مشکل و اغلب محیط کشت‌های ساخته گردیده دچار آلودگی می‌شوند (۵). بنابراین، ساختن محیط کشت انگل نیاز به افراد با تجربه ، نگهداری خرگوش نیاز به صرف هزینه‌ها و نیروی انسانی همراه با اتلاف وقت می‌باشد و گزارش شده است که عدم رشد پروماستیگوت (فرم تاژک‌دار) جدا گردیده از بعضی از اشکال لیشمانیوز جلدی مرطوب در محیط‌های کشت مصنوعی است (۶،۷).

نظر به این که تهیه خون انسان ساده‌تر و ارزان‌تر از خون خرگوش می‌باشد و در صورت رشد انگل در محیط کشت محتوی خون انسانی به دلایل مذکور امکان جایگزینی آن با محیط کشت محتوی خون خرگوش وجود دارد، بنابراین به منظور تعیین تاثیر گروه‌های خون انسان بر رشد عامل لیشمانیوز و مقایسه آن با محیط محتوی خون خرگوش، این تحقیق در گروه انگل شناسی‌کاشان طی سال ۱۳۷۴ انجام گرفت.

## موادو روشها

پژوهش حاضر با روش تجربی (Experimental) صورت پذیرفت. پروماستیگوت‌های L.Major با کد Mrho/Ir/64/Nadimi ، L.Tropica با کد Mhom/Su/F4/K27 و L.Infantum با کد Mhom/Ir/68/Er.Li مورد تایید سازمان جهانی بهداشت که از طریق مرکز تحقیقات و پژوهش‌های علمی دانشگاه تهران تهیه گردید و به طریق استریل در محیط کشت محتوی خون خرگوش و محیط‌های کشت حاوی خون انسان کشت داده شد.

محیط کشت ، محیط NNN (Novy-Macmeal-Nicole) بود که با استفاده از مواد و وسایل مورد نیاز و آماده سازی به روش استاندارد تهیه گردید (۴). جهت تهیه خون انسان به وسیله سرنگ یک بار مصرف ،

بعد از استریل کردن محل خون‌گیری، توسط الکل و بستن گارو، خون وریدی گرفته و در لوله‌های درپیچ‌دار محتوی سیترات سدیم تا هنگام تهیه محیط کشت در یخچال نگه‌داری شد.

برای تهیه خون خرگوش ، حیوان را در حالت خوابیده مهار کرده و محل قلب وی را با تیغ عاری از مو گردیده و با ساولن ، بتادین و الکل ۷۰ درصد ضدعفونی گردید و با سرنگ یک بار مصرف از قلب حیوان خون‌گیری و در لوله‌های محتوی سیترات سدیم ریخته و تا هنگام تهیه محیط کشت در یخچال نگه‌داری شد.

گروه‌های خونی انسان شامل A+ ، A- ، B+ ، B- ، AB+ ، AB- ، O+ ، O- و نیز خون خرگوش بود که در تهیه محیط کشت به کار رفت. تعداد ۴ لوله از هر کدام از محیط‌های ۹ گانه برداشته و به هر کدام از آنها به طریقه استریل ، تعداد یک سی سی سرم فیزیولوژی استریل حاوی تعداد معین پروماستیگوت اضافه نموده و لوله‌ها را در حرات ۲۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده و هر ۲۴ ساعت یک بار با استفاده از پی‌پت پاستور استریل و لام نئوبار انگل‌ها شمارش شدند. شمارش انگل با استفاده از فاز مایع محیط‌های‌کشت مقدار ۰/۱ سی‌سی‌درکنار شعله برداشته و روی لام‌نئوبارقرار داده‌بااستفاده‌ازلامل‌سطح آن را پوشانده وباعدسی ۴۰میکروسکوپ‌نوری ، تعداد پروماستیگوت‌ها شمارش گردید و تعداد انگل در یک سی‌سی محاسبه شد.

در این مطالعه زمان سازگاری با محیط (آداپتاسیون) ، حداکثر و حداقل رشد بر مبنای کاهش تعداد انگل های فعال از تعداد انگل از زمان کشت به روز محاسبه و ثبت گردید.

## یافته‌ها

تحقیق نشان داد که در کلیه گروه‌های خون انسان و خرگوش و در هر ۴ تکرار آن ، پروماستیگوت‌های L.Major ، L.Tropica و L.Infantum کشت داده شده در یک تا ۲ روز اول تعداد انگل‌ها برای سازگاری با محیط کاهش نشان داد و فرقی بین خون خرگوش و گروه‌های خون انسان نبود. بعد در تمام محیط‌ها تعداد انگل‌ها روبه افزایش یافته و در روزهای ششم تا دهم به حداکثر رشد خود رسید. در مقایسه در سه نوع انگل و در تمام گروه‌های خون انسانی ، زمان حداکثر رشد زودتر از خرگوش بود. سپس تعداد انگل‌های رشد یافته کاهش و در نمونه‌های محتوی ۸ گانه خون انسان از روز نهم تا هفدهم به میزان کمتر ازروزاول کشت کاهش یافت. همیشه‌خون‌خرگوش به مدت طولانی‌تر از گروه‌های خون انسان قادر به نگه‌داری انگل‌ها بود. جدول (۱) وضعیت آن را نشان می‌دهد.

میزان رشد پروماستیگوت‌های مورد مطالعه در محیط‌های ۹گانه در جدول (۲) ارایه گردید و نشان می‌دهد که‌رشدانگل L.Major ، L.Tropica و L.Infatum درمحیط کشت‌محتوی خون‌خرگوش‌بیشترین‌رشدرا داشت ($P<0/05$) و از بین گروه‌های خون انسان در گروه $B^-$ بیشترین رشد مشاهده گردید. مثلاً میزان رشد انگل L.Tropica در خون خرگوش (n=۴) $۵۳۴/۴\times۱۰^{۳} \pm ۳۶۴/۴\times۱۰^{۳}$ و همین انگل در گروه خونی $B^-$ برابر با (n=۴) $۱۹۵/۹\times۱۰^{۳} \pm ۳۲۶\times۱۰^{۳}$ بود ($P<0/05$).

پروماستیگوت L.Major در محیط‌های کشت محتوی گروه‌های خونی RH منفی انسان نسبت به RHمثبت ، رشد مناسب‌تری داشت ولی نسبت به خون خرگوش رشد کمتری دارا بود.

جدول ۱ـ توزیع زمان سازگاری، حداکثر و حداقل رشد پروماستیگوت فعال به تفکیک نوع انگل، خون خرگوش و گروه‌های خون انسان در کاشان طی سال ۱۳۷۴

| پروماستیگوت‌ها | روزها برای وضعیت رشد انگل فعال / محتوی خون | سازگاری با محیط (آداپتاسیون) | ماکزیمم تعداد رشد | می‌نیمم تعداد رشد |
|---|---|---|---|---|
| L.Major | $A^+$-$A^-$-$AB^+$ | اول | ششم | ۱۸ |
| | $B^-$-$AB^-$ | اول | هشتم | ۱۸ |
| | خرگوش-$O^-$-$O^+$ | اول | نهم | ۱۸ |
| L.Tropica | $O^+$ | اول و دوم | هشتم | ۱۵ |
| | $A^-$-$B^+$-$B^-$-$AB^+$-$AB^-$-$O^-$ | اول و دوم | نهم | ۱۵ |
| | خرگوش $A^+$ | اول و دوم | دهم | ۱۵ |
| L.Ifantum | $AB^+$-$AB^-$ | اول | هفتم | ۱۲ |
| | $B^+$ | اول | هشتم | ۹ |
| | $B^-$ | اول | هشتم | ۱۰ |
| | $A^+$-$A^-$ | اول | هشتم | ۱۲ |
| | $O^-$ | اول | هشتم | ۱۲ |
| | $O^+$ | اول | هشتم | ۱۳ |
| | خرگوش | اول | هشتم | ۱۷ |

جدول ۲ـ توزیع میزان رشد پروماستیگوت‌ها در محیط کشت محتوی خون خرگوش و گروه‌های خونی انسان به تفکیک انواع انگل در دانشکده پزشکی کاشان طی سال ۱۳۷۴

| پروماستیگوت / محیط‌های کشت | L.Mator (n=۱۹ روز) | L.Tropica (n=۱۶ روز) | L.Infatum (n= ) |
|---|---|---|---|
| خرگوش | $۱۶۰۴\times۱۰^{۳}\pm۱۴۵۹\times۱۰^{۳}$ | $۳۶۴/۴\times۱۰^{۳}\pm۵۳۴/۴$ | $۱۰۱\times۱۰^{۳}\pm۸۰/۸\times۱۰^{۳}$ |
| $A^+$ | $۴۱۴\times۱۰^{۳}\pm۶۸۵/۳\times۱۰^{۳}$ | $۱۷۱/۶\times۱۰^{۳}\pm۲۵۹/۷\times۱۰^{۳}$ | $۴۵/۷\times۱۰^{۳}\pm۲۲/۷$ |
| $A^-$ | $۷۸۹/۱\times۱۰^{۳}\pm۹۵۵/۵\times۱۰^{۳}$ | $۱۰۴/۳\times۱۰^{۳}\pm۱۲۷/۲\times۱۰^{۳}$ | $۲۷/۷\times۱۰^{۳}\pm۱۴/۲\times۱۰^{۳}$ |
| $B^+$ | $۵۶۵/۱\times۱۰^{۳}\pm۶۴۶/۸\times۱۰^{۳}$ | $۹۰/۹\times۱۰^{۳}\pm۱۰۶/۵\times۱۰^{۳}$ | $۳۳/۵\times۱۰^{۳}\pm۱۳/۹\times۱۰^{۳}$ |
| $B^-$ | $۹۴۲/۴\times۱۰^{۳}\pm۱۳۶۰\times۱۰^{۳}$ | $۱۹۵/۹\times۱۰^{۳}\pm۳۲۶\times۱۰^{۳}$ | $۴۲/۶\times۱۰^{۳}\pm۲۴/۸\times۱۰^{۳}$ |
| $AB^+$ | $۵۴۸/۵\times۱۰^{۳}\pm۹۸۰/۱\times۱۰^{۳}$ | $۴۵\times۱۰^{۳}\pm۷۰\times۱۰^{۳}$ | $۳۰/۳\times۱۰^{۳}\pm۱۸/۹\times۱۰^{۳}$ |
| $AB^-$ | $۱۰۵۳/۴\times۱۰^{۳}\pm۱۳۶۱\times۱۰^{۳}$ | $۱۴۹/۳\times۱۰^{۳}\pm۲۳۰/۳\times۱۰^{۳}$ | $۳۷/۶\times۱۰^{۳}\pm۲۲/۳$ |
| $O^+$ | $۴۱۴/۲\times۱۰^{۳}\pm۵۸۵\times۱۰^{۳}$ | $۳۸\times۱۰^{۳}\pm۴۱/۳\times۱۰^{۳}$ | $۳۷\times۱۰^{۳}\pm۲۷\times۱۰^{۳}$ |
| $O^-$ | $۷۹۸/۲\times۱۰^{۳}\pm۱۰۲۰/۸\times۱۰^{۳}$ | $۱۰۱۶/۲\times۱۰^{۳}\pm۱۶۳/۹\times۱۰^{۳}$ | $۲۲/۱\times۱۰^{۳}\pm۱۷/۳\times۱۰^{۳}$ |

در پـروماستیگوت L.Tropica ، در مـحیط کشت محتوی خون $A^-$ نسبت به $A^+$ و $B^-$ نسبت به $B^+$ ، $AB^-$ نسبت به $AB^+$ و $O^-$ نسبت به $O^+$ رشد بهتری داشـتند ولی در مقایسه با رشد پروماسیتگوت در محیط مـحتوی خون خرگوش همگی دارای رشد کمتری بودند.

در پـروماستیگوت‌های L.Infantum ، در مـحیط کشت محتوی خون $A^+$ نستب به $A^-$ ، $B^-$ نسبت به $B^+$ ، $AB^-$ نسبت بـه $AB^+$ ، $O^+$ نسـبت بـه $O^-$ رشـد بـهتری ملاحظه شد و در اینجا نیز نسبت به رشد پروماستیگوت‌ها در محیط محتوی خون خرگوش ، رشد ناچیزی به چشم خورد. آزمون آماری نشان داد که هـمه ایـن اخـتلافها بـه لحاظ آماری معنی‌دار است ($P< ۰/۰۵$).

## بحث

تحقیق نشان داد از نظر زمان سـازگاری انگـل بـا محیط کشت ، گروه‌های خون انسانی مثل خرگوش عـمل کرده ، از نظر زمان حداکثر رشد تعداد انگل ، گـروه‌های خون انسانی زودتر از خون خرگوش عمل کرده ولی بقای انگل در محیط کشت محتوی خـون خـرگوش بـیشتر از گروه‌های خون انسانی است. از نظر رشد تـعداد انگـل‌ها خون خرگوش مناسب‌تر از گروه‌های خون انسانی است و در بین گروه‌های خونی انسان ، گروه خونی $B^-$ مناسب‌تر از سایر گروه‌های خون انسانی است و بالاخره زمان رشد و میزان رشد انگل‌ها متفاوت بود. مساله تفاوت بین انگل‌ها را از نـظر زمـان ، مـیزان رشـد ، عـلایم بـالینی و شـدت ضایعات پوستی در لیشمانیوز جـلدی مـرطوب نـاشی از آلودگی با L.Major را بسیار متفاوت گزارش کرده‌اند (۱۰، ۹،۸،۶). مطالعات Lainson و همکاران در سال ۱۹۸۷ نیز نشان داد گونه‌های مختلف لیشمن در شـرایـط یکسـان و درجه حرارت و محیط کشت NNN متفاوت مـی‌باشند و بعضی دارای سرعت رشـد بـیشتر هسـتند و در تـعدادی پـروماستیگوت نـیز افـزایش بـیشتری دارد (۱۱). ایـن خصوصیات در شناسایی گـونه و زیـرگونه‌های لیشـمانیا بسیار مهم می‌باشد (۵).

انگـل در انـواع گـروه‌های خـون انسـانی و خـون خرگوش مـتفاوت عـمل مـی‌کند کـه بـه نـظر Griffiths و همکاران مساله نیازهای اولیه تغذیه برای رشد ، نـیاز بـه محرک‌های متفاوت برای شروع و ادامه تقسیم سلولی دارد و بعضی از عوامل ناشناخته دیگر از علل تفاوت مـنحنی رشد بین پروماستیگوت درگونه‌ها و زیرگونه‌های مختلف لیشمانیا می‌باشد(۱۰). در ایـن تـحقیق ، احـتمالاً خـون خرگوش برای رشد انگـل مـناسب‌تر از خـون گـروه‌های انسان است.

با توجه به این که میزان رشد پروماستیگوت‌های گونه‌های مختلف لیشمانیا در محیط NNN به طـور قـابل توجهی تحت تاثیر نوع آگار و نوع خون به کار رفـته در محیط کشت می‌باشد و عدم استفاده از یک نوع آگـار در تمام طول بررسی می‌تواند نتایج را تحت تاثیر قرار دهـد (۲). بنابراین، در این پژوهش نوع آگار ثـابت بـا مـقدار مشخص استفاده شد و خون به‌کار رفته به عنوان متغیر مد نظر قرار گرفت. از آنجایی که نیازهای اولیه تغذیه‌ای برای رشد ، نیاز به محرک‌های مـتفاوت بـرای شـروع و ادامـه تقسیم سلولی و بعضی از عوامل ناشناخته دیگـر از عـلل متفاوت بودن منحنی رشد بین پروماستیگوت‌ها درگونه‌ها و زیرگونه‌های مختلف لیشمانیا ذکر گردیده است (۳).

در این پژوهش نیز اگر چه تفاوتی در منحنی رشد اشکال مختلف پروماستیگوت به آسانی قابل توجیه نیست امّـا ایـن پـروماستیگوت‌ها در بـعضی از خـصوصیات متابولیک و بیوشیمیایی با یکدیگر متفاوت هستند . وجود مـیزان مـتفاوت فـعالیت اسـید فسـفاتاز در

پـروماستیگوت‌های مـجزا شـده از اشکـال مـختلف L.Major (۴) مؤید این نظریه می‌باشد.

به طور کلی تفاوت منحنی رشد پروماستیگوت‌ها در محیط کشت مصنوعی محتوی خون‌های مختلف تحت شرایط آزمایشگاهی کاملاً یکسان و تفاوت منحنی رشد در پـروماستیگوت‌های L.Tropica ، L.major و L. Infantum چنین مطرح می‌گردد که نیاز انگل به مواد غذایی جـهت رشد و تکـثیر در گـونه‌های مـختلف مـتفاوت است و در محیط کشت محتوی خون خرگوش دوام بیشتری دارند امّا با توجه به مشکل بـودن تـهیه خـون خـرگوش پـیشنهاد می‌گردد از خون انسان باگروه خونی $B^-$ استفاده شود چون زمان سازگاری انگل و زمان حداکثر رشد در مـقایسه بـا خون خرگوش اختلاف معنی‌داری ندارد و جهت تشخیص می‌تواند مفید واقع شود (۷).

با توجه به اهمیت سـرعت زمـان رشـد انگـل ، گروه‌های خون انسانی قادر به جایگزینی با خون خرگوش می‌باشد ، انجام تحقیق بر روی نمونه‌های انسانی توصیه می‌گردد.

## References:

۱- باقری م. بررسی وضع لیشمانیوز جـلدی در مـناطق شـمالی تـهران . پـایان نـامه جـهت دریـافت کـارشناسی ارشـد حشره‌شناسی . دانشکده بهداشت. دانشگاه تهران ؛ ۱۳۵۸.

۲- اردهالی ص. رضایی ح. ندیم ا. انگل لیشمانیا و لیشمانیوزها. تهران : مرکز نشر دانشگاهی؛ ۱۳۶۴ : ۱۶۳.

۳- لطفی ا. بررسی شیوع لیشمانیوز جلدی و ویژگیهای آن در شهر کاشان . پایان نامه جهت دریـافت دکـترای پـزشکی . دانشگاه علوم پزشکی کاشان : ۱۳۷۲ .

4. Aljeboori I. Traik R. A simple diphasic medium lacking whole blood of culturing leishmania spp. Tran R S Trop Med Hyg. 1979; 73: 117-121.

۵- طالاری ص. سوش‌های لیشمانیا به روش آنالیز ایزوآنزیم‌ها در مبتلایان به لیشمانیوز جلدی در اصفهان. پایان نامه جهت دریافت PhD انگل شناسی . دانشگاه علوم پزشکی اصفهان ؛ ۱۳۷۳: ۵۲.

6. Momeni AZ. Yotsumototo S. Mehregan DR. Chronic lupoid leishmaniasis exaluaion by polymerase chain reaction. Arch Dermatl. 1996; 132: 198-202.

۷- بقایی م. مقایسه رشد و دوره آلودگی در پروماستیگوت‌های جدا شده از اشکال متفاوت لیشمانیوز جلدی معرف. پژوهش در علوم پزشکی . ۱۳۷۶ ؛ ۳ (۲) : ۱۱۳-۱۰۸.

8. Al-gindan Y. Omer AHS. Al-humaiden YA. A case of mucocutaneous leishmaniasis in Saudi Arabia caused by leishmania major. Clin Exp Dermato. 1983; 8: 185-188.

9. El-Hassn AM. Meredith SE. Yagi HI. Sudanse mucosal leishmaniasis. epidemiology clinical

features diagnosis immune response and treatment. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1995; 89: 647-652.

10. Griffiths WAD. Old world cutaneous leishmaniasis. In: Peters W. Killick kendrick R (Eds). The Leishmaniasis in Biology and Medicine. New york: Academic Press; 1987: 617-635.

11. Lainson R. Shaw JJ. Evolution classification and geographical distribution. In: Peters W. Killick - Kedrih R (Eds). The Leishmaniasis in Biology and Medicine. New york: Academic Press; 1987; : 32-40, 95-99, 47-54.