مجله علمـــی پـژوهشـی دانشـگـاه علـوم پزشـکی اردبیـل

دوره ششم، شماره سوم، پاییز ۱۳۸۵، صفحات ۲۶۸ تا ۲۷۷

ارزیابی معرف لیشمانین استاندارد تولیدی ایران از نظرایمنی زایی، ویژگی، حساسیت و قدرت واکنش دهی

دکتر محمدحسین علی محمدیان[1]، دکتر سید حجت سید خلیل اللهی[2]، دکتر علی خامسی پور[3]، دکتر یحیی دولتی[4]

[1]نویسنده مسئول: استاد پاتوبیولوژی گروه ایمونولوژی، انستیتو پاستور ایران **E-mail:** mhalimohammadian@yahoo.com

[2]استادیار بیماری های پوست دانشگاه علوم پزشکی اردبیل [3] دانشیار میکروبیولوژی [4] استاد بیماری های پوست دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

زمینه و هدف: آزمون پوستی لیشمانین آزمون مونته نگرو یکی از شاخص های مهم برای سنجش واکنش های پرحساسیتی دیررس و ارزشیابی ایمنی سلولی در عفونت های لیشمانیایی می باشد. در این آزمون وجود آنتی ژن استاندارد لازم است. در مطالعه حاضر بچ های متعددی از آنتی ژن لیشمانین در شرایط کاملا استاندارد تهیه و با هدف تعیین ایمنی زایی، ویژگی، حساسیت و قدرت واکنش دهی آنها ارزیابی شد.

روش کار: برای ساخت لیشمانین، سوش استاندارد لیشمانیا ماژور (MRHO/IR/75/ER) در مخلوط برابر از محیط های کشت مایع D-MEM و ۱۹۹ TC Medium به صورت انبوه کشت داده شدند. انگل ها در مرحله ایستای رشد درو شدند و پس از شستشوهای متعدد برای تهیه معرف لیشمانین تحت شرایط کاملا استاندارد به کار رفتند. ایمنی زایی فرآورده های لیشمانین با انجام آزمون پوستی در خوکچه های هندی که از پیش ایمن شده بودند بررسی شد. ویژگی فرآورده ها و حساس شدگی غیرعادی به آنها از طریق آزمون پوستی در افراد سالم در مناطق غیر بومی سالک در تهران و تبریز بررسی شد. حساسیت و قدرت واکنش دهی معرف ها با انجام آزمون پوستی در افراد بهبود یافته از سالک در مناطق بومی سالک روستایی و شهری ارزیابی شد.

یافته ها: نتایج به دست آمده نشان داد که فرآورده های تولید شده لیشمانین به صورت کاملا پاک، بی ضرر و با ایمنی‌زایی بالا می باشند. ویژگی آنها در سطح بالاتر از ۹۹٪ ارزیابی شد و معرف های تزریقی هیچ گونه حساس شدگی غیر عادی ایجاد نکردند. حساسیت و قدرت واکنش دهی آن ها در مناطق آلوده به سالک روستایی بالاتر از ۹۶٪ با میانگین واکنش دهی ۱۸ - ۱۵ میلی متر و در مناطق سالک شهری بالاتر از ۹۳٪ با میانگین واکنش دهی ۱۴-۱۲ میلی متر تعیین شد.

نتیجه گیری: یافته ها نشان داد که این فرآورده ها پاک، بی ضرر، با ایمنی زایی، ویژگی، حساسیت و واکنش دهندگی بالا بودهو همچنین حساسیت غیر عادی ایجاد نمی کند. این فرآورده ها به راحتی در داخل کشور در دسترس بوده و می توان از آنها برای انجام آزمون پوستی جهت ردیابی پاسخ های پر حساسیتی دیر رس در عفونت های لیشمانیایی استفاده کرد.

واژه های کلیدی: آزمون پوستی لیشمانین، لیشمانیا ماژور، پرحساسیتی دیررس، آنتی ژن لیشمانین

دریافت: ۸٤/۸/۲۱ **اصلاح نهایی:** ۸۵/٤/۲۷ **پذیرش:** ۸۵/۶/۱۹

مقدمه

بیماری های لیشمانیایی طیف وسیعی از بیماری ها را تشکیل می دهند که در یک قطب آن، نوعی از عفونت بدون علامت و عفونت های خود بهبود یابنده واقع است و در قطب دیگر آن عفونت هایی با بیماریزایی شدید و قابل انتشار به بافت های احشایی مانند کالاآزار قرار دارند که در صورت عدم درمان به مرگ منتهی می گردد [۱]. در این بیماری ها علاوه بر اینکه گونه و

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-04-11]

نژاد انگل در شکل گیری حالت های بالینی متفاوت بیماری دخالت دارند، وضعیت ایمنی میزبان در نوع تظاهر بالینی بیمار نقش قاطعی را ایفا می نماید. از میان دو سیستم ایمنی مهم بدن پاسخ های ایمنی سلولی نقش بارزی در کنترل این بیماری به عهده دارند. بنابراین آزمون های مربوط به سنجش ایمنی سلولی[1] می تواند به عنوان وسیله ای ارزشمند در جهت شناخت وضعیت ایمنی فرد، مصون بودن او در برابر عفونت مجدد و نیز بررسی اثر بخشی واکسن‌های معرفی شده برای پیشگیری و کنترل عفونت های لیشمانیایی به کار رود. یکی از شاخص های مهم و معمول برای سنجش ایمنی با واسطه سلولی، واکنش پرحساسیتی دیررس می باشد. DTH[2] یکی از اشکال عمده ایمنی با واسطه سلول های T اختصاصی آنتی ژن است [۲]. وجود یک واکنش DTH را می توان به طور تجربی از طریق تزریق داخل پوستی آنتی ژن ردیابی نمود. در محل تلقیح آنتی ژن پس از ٤٨ یا ۷۲ ساعت واکنش پوستی به صورت آماس سفتی ایجاد می شود که قابل اندازه گیری است. واکنش پوستی مثبت نشان دهنده وجود جمعیتی از سلول های Th_1 حساس شده ویژه آنتی ژن در فرد تزریق شده است. واکنش پوستی از ارتشاح وسیع سلول ها به جایگاه تزریق در جریان واکنش DTH ایجاد می شود و معمولا ۹۰-۸۰ درصد این سلول ها را ماکروفاژ ها تشکیل می دهند [۳].

در بیماری های لیشمانیایی ردیابی پاسخ های پرحساسیتی دیررس با آزمون های پوستی لیشمانین یا تست مونته نگرو انجام پذیر است که تنها آزمون داخل بدنی برای سنجش ایمنی سلولی است. این آزمون توسط مونته نگرو در سال ۱۹۲۶ ارایه شده است [٤]. در لیشمانیوز پوستی خود شفا (سالک) آزمون پوستی لیشمانین در طول دوره عفونت، پیدایش زخم و نیز در جریان بهبود زخم در اغلب افراد مثبت می باشد. به علاوه این آزمون در افراد بهبود یافته از سالک تقریبا در ۱۰۰٪ موارد مثبت است و در بسیاری از افراد برای تمام عمر و یا برای مدت های مدید مثبت باقی می‌ماند [۶،۵]. عدم پاسخ دهی در برابر آنتی ژن پوستی لیشمانین نشان دهنده حالت آنرژی نسبت به آنتی ژن مربوطه است که معمولا در بیماران مبتلا به کالاآزار در مرحله حاد بیماری مشاهده می شود. با این حال به دنبال درمان یا بهبود از کالاآزار و از بین رفتن علایم بالینی ، پاسخ آزمون پوستی لیشمانین در اکثر بهبود یافتگان از منفی به مثبت برگشت می نماید [۸،۷].

آزمون لیشمانین کاربرد های متعدد دارد. در ارزیابی کارایی واکسن، برای انتخاب داوطلبانی که قبلا در معرض آلودگی به لیشمانیا قرار نگرفته اند از این آزمون استفاده می شود. این آزمون وسیله ارزشمند و حساس برای بررسی توانایی ایمنی زایی [۱۱-۹] و کارآیی واکسن های کاندیدای لیشمانیوز می باشد [۱۵-۱۲]. همچنین از آزمون پوستی لیشمانین برای مطالعات همه گیری شناسی لیشمانیوز ، از جمله تعیین فراوانی عفونت و مشخص کردن میزان بروز آلودگی در سطح وسیعی استفاده می شود [۱۸-۱۶]. به علاوه این آزمون یک ابزار کمکی برای تشخیص بیماری های لیشمانیوز پوستی می باشد، به ویژه در مواردی که تعداد انگل در بافت های آلوده بدن بسیار کم بوده و با روش های رایج ردیابی آنها امکان پذیر نباشد[۱۹].

روش کار

در مطالعه حاضر برای تهیه لیشمانین ابتدا سوش لیشمانیا ماژور از نژاد واکسن MRHO/IR/75/ER در مخلوط مساوی از دو محیط مایع D-MEM[3] و TC Medium 199 (هر دو از Sigma ، آلمان) به همراه ۱۰ تا ۲۰ درصد سرم جنین گوساله (GIBCOBRL, Australia origin) در شرایط کاملا استاندارد GMP[4] به صورت انبوه کشت داده شد. آنگاه انگل ها در مرحله ایستای رشد درو شدند و پس از پنج بار شستشو با PBS[5] آپیروژن، آنتی ژن متراکم تهیه

[1] Cell-mediated immunity
[2] Delayed-type Hypersensitivity

[3] Dulbeco's Modified Eagled Medium
[4] Good Manufacturing Practice
[5] Phosphate Baffered Saline

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-04-11]

شده با حجم برابر از PBS حاوی ۰/۵٪ تایمروسال مخلوط شدند. انگل های کاملا کشته و ثابت شده در حجم مناسبی از PBS حاوی ۰/۰۱٪ تایمروسال رقت داده شدند، به طوری که تعداد انگل ها در فرآورده نهایی روی ۶×۱۰^{۶} در میلی لیتر میزان شد. پس از دریافت مدارک پذیرش از بخش کنترل کیفی فرآورده‌های بیولوژیک (BS.QC) واحد تولید انستیتو پاستور در کرج، فرآورده ها در زیر هود و زیر شرایط کاملا استریل در ویال های ۱۰ میلی لیتری عاری از پیروژن در حجم ۲/۲ میلی لیتر تقسیم شدند. از کلیه مراحل کشت و تهیه آنتی ژن نمونه برداری شده و در بخش کنترل کیفی از نظر پاکی (استریل بودن) بررسی شدند. همچنین فرآورده های نهایی از نظر آزمون‌های بی ضرری مانند توکسیستی غیر معمول، سنجش اندوتوکسین با استفاده از آزمون LA (Limulus amoebocyte lysate)، آزمون های زنده بودن انگل و ارزیابی های بیوشیمیایی مانند میزان قند تام ، pH ، اندازه گیری پروتئین توتال (روش Lowery) و الکتروفورز نمونه هایی از فرآورده های لیشمانین روی ژل SDS-PAGE مورد بررسی و کنترل کیفی قرار گرفتند.

برای ارزیابی روش های استفاده شده لیشمانین شامل:

الف- بررسی ایمنی زایی در خوکچه هندی:

ایمنی زایی فرآورده های تهیه شده در سه خوکچه هندی بررسی شد. برای این منظور ابتدا حیوانات با تزریق ۲۵×۱۰^{۶} انگل (پروماستیگوت) کشته شده لیشمانیا ماژور ایمونیزه شدند و پس از سنجش عیار آنتی بادی به روش الیزا ، آزمون پوستی در ناحیه تراشیده شکم با تزریق همزمان ۰/۱ میلی لیتر از فرآورده های مختلف لیشمانین به صورت داخل پوستی در مقایسه با بچ های قبلی انجام شد. پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت واکنش های پوستی که به صورت سفتی (اندوراسیون) ایجاد شده بود با خط‌کش میلی متری اندازه گیری و ثبت شدند.

ب- ارزیابی ویژگی فرآورده:

ویژگی آنتی ژن های تهیه شده در افراد طبیعی ، سالم و بدون سابقه بیماری های لیشمانیوز و در مناطقی که بیماری لیشمانیوز به صورت بومی وجود ندارد ارزیابی شد. یک بررسی در دبیرستانی در جنوب تهران روی ۱۶۸ دانش آموخته سالم در گروه سنی ۱۷-۱۲ سال با اخذ مجوز اولیای دبیرستان و رضایت دانش آموزان انجام شد. بررسی دیگر در شهرستان تبریز که یک منطقه غیر بومی لیشمانیوز است در روی همراهان سالم مراجعین به درمانگاه پوست بیمارستان هفت تیر به صورت کارآزمایی تصادفی دو سوکور با شاهد PBS در روی ۲۳۲ نفر فرد سالم (۱۲۳ مذکر و ۱۰۹ مونث) بدون سابقه بیماری های لیشمانیوز و با سابقه پنج سال اقامت مداوم در منطقه غیر بومی تبریز در گروه سنی ۶۰ - ۹ سال با اخذ رضایت از داوطلبان یا والدین آنها انجام شد.

در کنار بررسی ویژگی فرآورده های لیشمانین، حساس شدگی غیر عادی افراد در برابر مواد نگهدارنده که به طور معمول در ساخت معرف لیشمانین به کار می‌روند ارزیابی شد. این بررسی نیز در طی کارآزمایی دو سوکور تصادفی، روی ۲۳۲ نفر در تبریز با استفاده از لیشمانین های تهیه شده با تایمروسال، فنل و محلول‌های کنترل آنها که با PBS تهیه شده بود، یعنی PBS تایمرساله و PBS فنله انجام شد. در این بررسی هر گونه واکنش ایجاد شده در برابر معرف ها به دقت ثبت شده و مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفتند.

ج- ارزیابی حساسیت و میزان واکنش دهی (پتانسی) لیشمانین:

حساسیت هر کدام از بچ های تولیدی در افراد بهبود یافته از سالک در مناطق بومی سالک بررسی شد. از آنجایی که آنتی ژن های گونه های مختلف انگل لیشمانیا برای سال های متمادی در افراد بزرگسال و کودکان بدون ایجاد عوارض ناگوار و جدی مورد استفاده قرار گرفته اند [۱۹]، بنابراین در این بررسی‌ها، آزمون های پوستی روی دانش آموزان ۱۸-۸ ساله با اخذ رضایت اولیای مدرسه و دانش آموزان و یا افراد ساکن روستا انجام گرفت. حساسیت و میزان

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-04-11]

واکنش دهی لیشمانین در چهار منطقه بومی سالک بررسی شد: الف- کانون سالک روستایی در شمال اصفهان (عامل آن لیشمانیاماژور)، ب- کانون سالک شهری در شمال غرب تهران (پونک، حصارک و جنت آباد) (عامل آن لیشمانیا تروپیکا)، ج- کانون جدید سالک روستایی در جنوب شرقی کاشان (روستاهای اطراف ابوزیدآباد) و د- کانون اخیر سالک روستایی در روستاهای اطراف دامغان. همچنین در دو بررسی جداگانه حساسیت و واکنش دهی بچ های مختلف لیشمانین، با فرآورده های قبلی و قدیمی مورد مقایسه قرار گرفتند. این بررسی ها با تزریق هم زمان دو لیشمانین در دو قسمت از پوست بازوی فرد بهبود یافته انجام شد.

برای انجام آزمون پوستی لیشمانین ابتدا آنتی ژن از طریق به هم زدن چرخشی و بالا پایین نمودن ویال به طور کامل مخلوط شد، سپس با سرنگ مانتو و سوزن ۲۶ مقدار ۰/۱ میلی لیتر از آنتی ژن به صورت اینترا درمال در ناحیه ساعد یا بازو در جایگاه بدون مو تزریق شد. بعد از ٤٨ یا ۷۲ ساعت به دور ناحیه متورم واکنش با خودکار خطی کشیده شد و قطر سفتی (اندوراسیون) با خط کش میلی متری در دو جهت عمود برهم اندازه گیری شد و متوسط دو قطر سفتی به عنوان پاسخ آزمون ثبت گردید [۲۰]. پاسخ های برابر یا بیشتر از پنج میلی متر به عنوان واکنش مثبت تلقی شدند. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده آزمون تی و با استفاده از نرم افزار آماری SigmaStat از شرکت Jandle Scientific انجام شد.

یافته ها

کلیه فرآورده های لیشمانین تولید شده به صورت پاک (استریل)، غیر سمی، بدون اندوتوکسین غیرعادی و فاقد انگل زنده گزارش شدند، بنابراین کاملا بی ضرر و قابل استفاده در انسان می باشند. این فرآورده ها به طور معمول دارای pH ۶/۹ الی ۷/۱ ، پروتئین تام بین ۶۵-۵۰ میکروگرم و فاقد کربوهیدرات یا در حد ناچیز می باشند(شکل ۱).

یافته های به دست آمده از بررسی آزمون پوستی در خوکچه های ایمن شده نشان داد که کلیه بچ های تولید شده با تفاوت هایی نه چندان زیاد واکنش پوستی مثبت ایجاد نموده اند. میانگین قطر سفتی آزمون پوستی در اولین بچ تولیدی (لات ۱۰۹) در حدود ۱۰ میلیمتر و در آخرین بچ های تولیدی (لات ۱-۱۲۳ و ۲-۱۲۳) بین ١٤-۱۲ میلی متر بود.

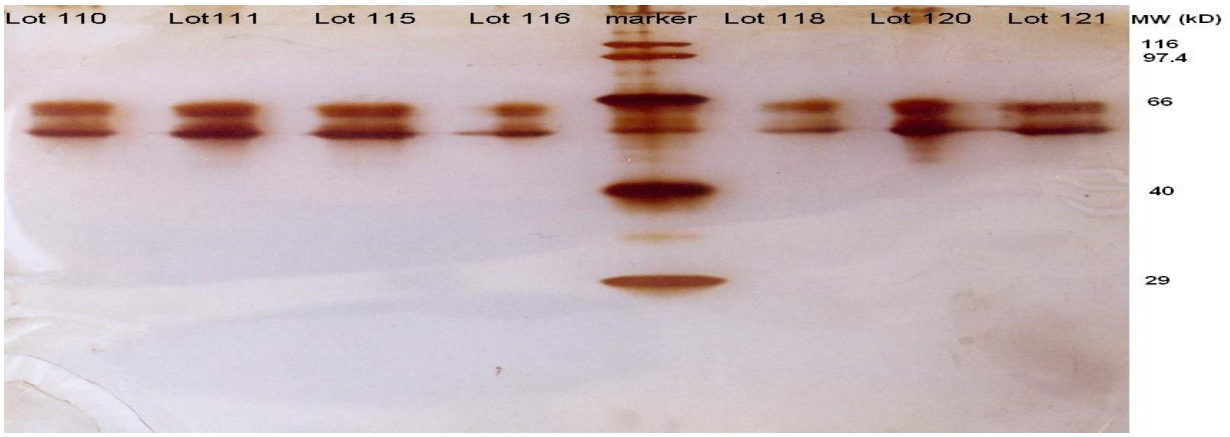
در مورد تعیین ویژگی معرف لیشمانین، در بررسی انجام شده در تهران ویژگی هر دو نوع لیشمانین ۱۰۰٪ و در تبریز بالاتر از ۹۹٪ تعیین شد (جدول ۱).

در مطالعه حاضر حدود ۹۰ ٪ افراد سالم در برابر لیشمانین تایمرو ساله هیچ گونه واکنشی نشان ندادند و حدود ۱۰ ٪ واکنش های ۱ تا ۵ میلی متر نشان دادند. این یافته در مورد محلول کنترل PBS تایمرسوله نیز نمود پیدا کرد. اما در مورد لیشمانین فنله در حدود ۳۶ ٪ از افراد هیچ گونه واکنشی نشان ندادند و ٦٤٪ از افراد سالم واکنش های ۱ تا ۵ میلیمتر نشان دادند. همچنین در حدود ۳۰ ٪ افراد در برابر محلول کنترل (PBS) فنله هیچگونه واکنشی نمودار نساختند و ۷۰ ٪ از آنها واکنش های ۱تا ۵ میلیمتر نشان دادند (جدول ۲) حساسیت و قدرت واکنش دهی لیشمانین با بررسی روی سه بچ از لیشمانین در دو منطقه بومی متفاوت سالک یعنی شمال اصفهان که کانون مهم سالک روستایی و شمال غربی تهران که کانون سالک شهری می باشد تعیین شد (جدول ۳، ٤). حساسیت فرآورده ها در مناطق بومی سالک روستایی در حدود ۹۷٪ و با میانگین واکنش دهی بین ۱۸-۱۵ میلی متر و در مناطق بومی سالک شهری بین ۹۷-۹۳ درصد با میانگین واکنش دهی ١٤-۱۲ میلی متر به دست آمد (جدول ۵).

فرآورده های جدید لیشمانین در مقایسه با بچ های قبلی حساسیت یکسان نشان دادند و با استفاده از آزمون Z تفاوت معنی داری بین آنها دیده نشد. از نظر وسعت واکنش دهی نیز بین لات های مختلف که فاصله زمانی تولید آنها کمتر از پنج سال بود یعنی لات ۱-۱۲۲ با لات های ۱-۱۲۳ و ۲-۱۲۳ و نیز لات ۱-۱۲۳ با لات ١٢٤ تفاوت معنی داری مشاهده نشد.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-04-11]

شکل ۱. الگوی تجزیه الکتروفورزی فرآورده های مختلف لیشمانین با روش SDS-PAGE. ۵۰ میکرو لیتر از هر فرآورده روی ژل آکریل آمید ۱۰٪ الکتروفورز شده و سپس با ترکیبات نقره رنگ آمیزی شده است. از سمت چپ به ترتیب ردیف های یکم الی چهارم و ششم الی هشتم فرآورده های مختلف لیشمانین و ردیف پنجم شاخص (مارکر) می باشد



جدول ۱. بررسی ویژگی لیشمانین تایمروساله و فنله در یک کارآزمایی دوسوکور تصادفی با شاهد pbs (در منطقه غیر بومی لیشمانیوز)

نوع فراورده	تعداد افراد تحت آزمون	تعداد افراد تست مثبت*	تعداد افراد تست منفی	در صد اختصاصیت
لیشمانین تایمروساله	۲۳۲	۱	۲۳۱	۹۹/۵۷
لیشمانین فنله	۲۳۲	۲	۲۳۰	۹۹/۱٤

*** اندوراسیون برابر یا بالاتر از ۵ میلی متر**

جدول۲. مقایسه حساس شدگی غیر عادی در برابر معرف های لیشمانین تایمروساله ، فنله و محلول های کنترل آنها در یک بررسی دو سو کور با شاهد در منطقه غیربومی تبریز روی ۲۳۲ فرد سالم بدون سابقه لیشمانیوز و بیماری های مهم دیگر

نوع معرف		٪ عدم واکنش (LST=0)	در صد واکنش در محدوده ۵-۱ میلیمتر بر حسب میلی متر				٪ واکنش مثبت (LST >۵)
			۱ -۱/۹۹	۲ -۲/۹۹	۳ -۳,۹۹	٤ -٤/۹۹	
لیشمانین تایمروساله	PBS	۸۹/۶۵	۶/٤۵	۲/۵۸	۰/۸۶	-۰-	۰/٤۳
محلول تایمروساله		۹۰/۰۸	۵/۱۷	۳/۸۷	۰/٤۳	۰/٤۳	۰
لیشمانین فنله		۳۶/۲۰	۲۲/٤۱	۲۸/۰۱	۷/۳۲	۵/۱۷	۰/۸۶
محلول PBS فنله		۲۹/۷۳	۲۶/۲۹	۲۸/۸۷	۱۲/۹۳	۱/۷۲	۰/٤۳

جدول ۳. بررسی حساسیت و قدرت واکنش دهی سه فرآورده از لیشمانین در افراد بهبود یافته از سالک روستائی در منطقه بومی سالک روستائی (مناطق روستائی شمال اصفهان)

شماره بچ لیشمانین	تعداد کل افراد بررسی شده	گروه سنی افراد	تعداد افراد تست مثبت *	در صد حساسیت	میانگین اندوراسیون به میلی متر
لات ۱۰۹	۱۳۶	۱۳ – ۷ سال	۱۳۲	۹۷/۰۵	۱۸/۰٤ ± ۵/۲۲
لات ۱۱۰	۷۲	۱۳ – ۷ سال	۶۹	۹۶/۸۳	۱۶/۱۳ ± ٤/۷۹
لات ۱۱۱	۶٤	۱۳ – ۷ سال	۶۲	۹۶/۸۷	۱۵/۱۸ ± ۳/۹۳

*** اندوراسیون برابر یا بالاتر از ۵ میلی متر**

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-04-11]

جدول٤. بررسی حساسیت و قدرت واکنش دهی سه فرآورده مختلف از لیشمانین در افراد بهبود یافته از سالک شهری در منطقه بومی سالک شهری (شمال غربی تهران)

شماره لات لیشمانین	تعداد کل افراد بررسی شده	گروه سنی افراد	تعداد افراد تست مثبت *	در صد حساسیت	میانگین اندوراسیون به میلی متر
لات ۱۰۹	٤۶۰	۱۸-۹ سال	٤۲۸	۹۳/۰٤	۱٤/۲۱ ± ۵/۰۰
لات ۱۱۰	۱۱۹	۱۸-۹ سال	۱۱۲	۹٤/۱۲	۱۱/۸۵ ± ۳/۷۸
لات ۱۱۱	۳۲	۲۵-۶ سال	۳۱	۹۶/۸۷	۱۲/۲۹ ± ٤/۹٤

*** اندوراسیون برابر یا بالاتر از ۵ میلی متر**

جدول۵. مقایسه حساسیت و میزان واکنش دهی فرا ورده های مختلف از لیشمانین روی افراد بهبود یافته از سالک در منطقه بومی سالک روستائی در اطراف کاشان و دامغان در سه بررسی مقایسه ای با تزریق همزمان دو لیشمانین در یک بازوی داوطلب

نام منطقه اندمیک	شماره لات لیشمانین	تعداد افراد تست شده	حساسیت لیشمانین		آیانگین قطر اندوراسیون (به میلی متر)
			تعداد افراد تست مثبت	در صد حساسیت	
روستاهای کاشان	لات۱- ۱۲۲	۵۵	۵۵	۱۰۰	۱۶/۶۳ ± ٤/۵۹
	لات ۱-۱۲۳	۵۵	۵۵	۱۰۰	۱۶/٤۱ ± ٤/۷۸
روستاهای کاشان	لات ۱-۱۲۲	۵۶	۵۵	۹۸/۲	۱۵/۳۶ ± ۵/۶۸
	لات ۲-۱۲۳	۵۶	۵۵	۹۸/۲	۱۶/۲۰ ± ۵/۷۱
روستاهای دامغان	لات ۱-۱۲۳	٤۲	٤۱	۹۷,۶	۱۵/٤۹ ± ٤/۹۵
	لات ۱۲٤	٤۲	٤۲	۱۰۰	۱۵/۵۶ ± ۵/۹۶

بحث

ایمنی با واسطه سلولی در کنترل عفونت های لیشمانیوز و القای مصونیت در برابر آلودگی مجدد به این انگل ها از نقش قاطعی برخوردار است. به دنبال تولید اولین فرآورده لیشمانین، بچ های متعدد دیگری از لیشمانین به صورت نیمه صنعتی در شرایط GMP تولید شد و مورد ارزیابی های دقیق قرار گرفت.

بررسی های انجام شده روی ویژگی این فرآورده ها نشان داد که این فرآورده ها دارای ویژگی بسیار بالا هستند. در یک بررسی معرف های لیشمانین ویژگی ۱۰۰٪ را نشان دادند. در بررسی دیگر نیز که به صورت دو سو کور تصادفی با شاهد PBS انجام شد، ویژگی دو نوع مختلف از فرآورده های لیشمانین بالاتر از ۹۹٪ تعیین شد (جدول ۱). نتایج این بررسی ها حاکی از آن بود که این معرف ها در افراد سالم و طبیعی موجب القای واکنش های متقاطع نمی شوند و یا اینکه واکنش‌ها در درصد بسیار کم و در حد بسیار ناچیزی القا می شوند.

این نتایج با یافته های ویگل[1] در مورد ویژگی لیشمانین تولیدی آنها از گونه L.braziliensis panamensis در افراد سالم در کلمبیا کاملا همخوانی نشان می دهد و ویژگی بالای فرآورده های لیشمانین از گونه های مختلف را نمودار می سازد [۲۱].

بررسی حساس شدگی غیر طبیعی در برابر آنتی ژنهای لیشمانین و نیز مواد نگهدارنده آنها نشان داد که حساس شدگی غیر طبیعی نسبت به آنتی ژن های تهیه شده با تایمروسال و فنل وجود ندارد. با این حال بررسی دقیق تر روی واکنش دهی افراد سالمی که آزمون لیشمانین آن ها منفی (کمتر از پنج میلی متر) بود نشان داد که تفاوت هایی از نظر قطر واکنش ایجاد شده (در محدوده واکنش منفی) نسبت به تایمروسال و فنل وجود دارد (جدول ۲) و واکنش های ایجاد شده در افراد سالم در برابر لیشمانین فنله به مراتب بیشتر از لیشمانین تایمرسوله می باشد. این یافته ها به وضوح

[1] Weigle

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-04-11]

نشان دادند که سالم ترین ماده نگهدارنده برای تولید لیشمانین که موجب القای هیچ گونه واکنشی نمی شود یا در درصد ناچیزی از افراد سالم واکنش های بسیار خفیف ایجاد می کند، ماده نگهدارنده تایمروسال می‌باشد و بنابراین کلیه بچ های لیشمانین با استفاده از این ماده نگهدارنده تهیه شده اند.

حساسیت فرآورده های لیشمانین در بررسی های متعدد انجام شده در مناطق بومی سالک روستایی در مورد بچ های مختلف در محدوده ۱۰۰- ۹۵ در صد تعیین شد که با بررسی ویگل و همکاران در کلمبیا در مورد آنتی ژن لات I آنها که ۹۸/۵٪ گزارش شده تا حدودی همخوانی دارد، اما حساسیت بچ های مختلف لیشمانین ایران در مقایسه با آنتی ژن های لات II و III آنها (که حساسیت آنها در محدوده ۹۶-۸۱ گزارش شده است) به مراتب بالاتر می باشد[۲۱].

همچنین حساسیت فرآورده های لیشمانین در مناطق بومی سالک شهری، که عامل بیماری در این مناطق لیشمانیا تروپیکا بوده و با انگل به کار رفته در تولید لیشمانین که لیشمانیا ماژور است از دو گونه متفاوت می باشند، بالاتر از ۹۳٪ تعیین شد. پاسخ های حساسیت و پتانسی بالای لیشمانین در افراد بهبود یافته از سالک شهری نشان می دهد که بین دو گونه لیشمانیا ماژور و لیشمانیا تروپیکا واکنش دهندگی متقاطع نیرومندی موجود است. وجود واکنش های متقاطع میان گونه لیشمانیا ماژور موجود در معرف لیشمانین ایران با گونه‌های دیگر لیشمانیا در بررسی های محققان دیگر نیز یادآوری شده است، به عنوان مثال وجود واکنش های متقاطع بین لیشمانیا ماژور موجود در لیشمانین ایران با لیشمانیا دونووانی در بررسی انجام شده در سودان [۲۲] و با لیشمانیا برازیلینسیس در بیماران و بهبود یافتگان از لیشمانیوز در نیکاراگوئه و تا حدودی با لیشمانیا اتیوپیکا در ۵۰ ٪ بیماران مبتلا به لیشمانیوز پوستی در اتیوپی [۲۳] به اثبات رسیده است. بررسی های مقایسه ای نیز با استفاده از معرف لیشمانین ایران به عمل آمد. از جمله در طی یک بررسی لیشمانین ایران با لیشمانین های تهیه شده توسط شرکت ولکام انگلستان و لیشمانین ساخته شده توسط یک شرکت در ایتالیا (که تعدادی از معرف های تولیدی آنها از طریق TDR برای مقایسه در اختیار گذاشته شده بود) روی افراد بهبود یافته در منطقه بومی سالک شهری ، مورد مقایسه وارزیابی قرار گرفت. یافته ها نشان دادند که حساسیت لیشمانین ایران با لیشمانین ولکام برابر است ولی به مراتب از لیشمانین ایتالیا بالاتر می باشد [۲٤]. بررسی به عمل آمده توسط پژوهشگران کشور های دیگر نیز حساسیت بالای لیشمانین ایران را نسبت به لیشمانین ایتالیا در منطقه بومی کالاآزار نشان داد [۲۲].

قدرت واکنش دهی (پتانسی) لیشمانین در منطقه بومی سالک روستایی (با میانگین ۱۸-۱۵ میلی متر) و در منطقه بومی سالک شهری (با میانگین تقریبی ۱٤-۱۲ میلی متر) تعیین شد که مشخص کننده واکنش دهندگی بسیار بالای این معرف می باشد. در بررسی مقایسه ای با معرف های ولکام و ایتالیا نیز چه در ایران [۲٤] و چه توسط پژوهشگران کشور های دیگر [۲۲] لیشمانین ایران واکنش دهندگی بالاتری را نسبت به آنتی ژن های دیگر نشان داد. پتانسی لیشمانین ایران در مقایسه با بررسی کلمبیا نیز بسیار بالاتر از هر سه آنتی‌ژن آنها می باشد [۲۱]. دلایل این برتری در حساسیت و قدرت واکنش دهی چندان روشن نیست و احتمال دارد عوامل متعددی در آن تاثیر داشته باشند. از جمله می توان به تفاوت های آنتی ژنی موجود در گونه های مختلف انگل های لیشمانیا اشاره نمود و یا ممکن است روش های به کار رفته از جمله حفظ ویرولانس انگل، نوع ماده محافظ به کار رفته و فرایند ساخت آنتی ژن علت اصلی آن باشد و احتمال دیگر اینکه به نظر می رسد ایمنی سلولی و مصونیت ایجاد شده در عفونت های لیشمانیوز پوستی روستایی معمولا دارای استحکام و پایداری بیشتری بوده و شاید پاسخ های القا شده توسط این گونه از شدت بیشتری بر خوردار می باشند.

در بررسی مقایسه ای که روی بچ های مختلف لیشمانین انجام شد، بچ های مختلف لیشمانین حتی

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-04-11]

آنهایی که ۱۲ سال پیش ساخته شده بودند (لات ۱۰۹) حساسیت کافی برای ردیابی سابقه عفونت های لیشمانیایی را نشان دادند، با این حال بچ های قدیمی (لات ۱۰۹ و لات ۱-۱۲۱) نسبت به بچ های جدید تر (لات ۱-۱۲۲ و لات ۲-۱۲۲) به طور معنی دار واکنش کمتری نشان دادند. اما در بچ هایی که تاریخ ساخت آنها با همدیگر فاصله زمانی کمتری داشتند تفاوت معنی دار در واکنش دهی مشاهده نشد.

بررسی های به عمل آمده در این بخش و نیز در سایر مطالعات نشان داده که به موازات پیدایش زخم های لیشمانیایی در انسان، آزمون پوستی لیشمانین در اکثر افراد مبتلا مثبت می شود [۷]. با این حال در جریان بهبود و نیز پس از بهبود کامل ضایعه های لیشمانیایی، معمولا پاسخ های آزمون لیشمانین دارای دامنه واکنش‌دهی بیشتر می باشند [۲٤]. وجود یک واکنش مثبت نشان دهنده شکل گیری پاسخ ایمنی با واسطه سلولی به صورت اختصاصی بر علیه آنتی ژن تزریق شده و نشانه حضور جمعیتی از سلول های T خاطره ای در فرد مورد بررسی می باشد اما رابطه آن با ایجاد مصونیت در برابر عفونت لیشمانیایی هنوز در پرده ابهام قرار دارد. شاید همان گونه که توسط یکی از محققان پیشنهاد شده است این امکان وجود دارد که بتوان پاسخ مثبت را به عنوان علامت مطلوبی از وجود یک ایمنی با واسطه سلولی تلقی کرد [۲۲] چرا که در مراحل حاد عفونت های لیشمانیوز احشایی آزمون لیشمانین معمولا منفی است اما پس از بهبود از عفونت در بیش از ۸۰٪ موارد به حالت مثبت برگشت می نماید.

تا کنون از فراورده های لیشمانین در ارزیابی ایمنی‌زایی و کارایی واکسن کشته شده لیشمانیا در ایران [۹، ۱۰، ۱۲، ۱۳] و سودان [۱۱، ۲۵] استفاده شده است. همچنین در مطالعات پژوهشی توسط پژوهشگران سوئد [۲۳]، برزیل [۲۶]، سودان و انگلستان [۲۷] و کشورهای دیگر مانند دانمارک، گواتماله، هند، اتیوپی، کنیا، یونان و غیره از این معرف به منظور مطالعات همه گیری شناسی و ارزیابی وضعیت ایمنی بیماران استفاده شده است.

نتیجه گیری

یافته های به دست آمده از این بررسی دلالت دارند که فرآورده های لیشمانین معرف هایی هستند کاملا استاندارد، پاک، بی ضرر که هیچ گونه عوارض ناگوار جدی و حساسیت غیر عادی در بدن انسان ایجاد نمی‌کنند. همچنین ارزیابی این فرآورده ها در مناطق مختلف غیر بومی و بومی سالک نشان داده است که آنها از ویژگی، حساسیت و قدرت واکنش دهندگی بالا برخوردار هستند و بنابراین می توانند به راحتی در بررسی های همه گیری شناسی، ایمنی شناسی، ارزیابی واکسن های نامزد برای کنترل بیماری های لیشمانیوز و در برخی موارد برای تشخیص بیماری لیشمانیوز به ویژه در مواردی که تعداد انگل کم بوده و بیماری با روش های معمولی قابل تشخیص نیست به کار روند.

تشکر و قدردانی

مولفان از کلیه داوطلبان ساکن روستاهای شمال اصفهان، ابوزیدآباد و دامغان، شهرک های شمال غربی تهران و شهرستان تبریز که صمیمانه در این طرح ها همکاری نموده اند سپاسگزاری می نمایند. از مسئولان دانشگاه های علوم پزشکی و همکاران مراکز بهداشتی اصفهان، تبریز، کاشان، آران بیدگل و سمنان و نیز از اولیای امور مناطق ۵ و ۱۱ آموزش و پرورش استان تهران که در جهت تسهیل اجرای این طرح ها همکاری صمیمانه ای داشتند تشکر و قدردانی می نماییم. همچنین به خاطر راهنمایی های بی شائبه استاد ارجمند آقای دکتر فرخ مدبر در مراحل مختلف طرح از ایشان صمیمانه تشکر می نماییم. از همکاران ارجمند بخش کنترل کیفی فرآورده های بیولوژیکی مجتمع تولیدی انستیتو پاستور ایران به ویژه خانم دکتر دیزجی به خاطر همکاری های صمیمانه در کنترل کیفی مراحل مختلف تولید لیشمانین صمیمانه سپاسگزاری میکنیم. همچنین لازم است از همکاران ارجمند انستیتو و بخش ایمونولوژی خانم دکتر شیرین ملک زاده ، آقای فرهاد

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-04-11]

ریاضی ، خانم ملیحه زمان وزیری و آقای داود ایروانی به خاطر همکاری های تکنیکی نهایت تشکر و سپاسگزاری را به نماییم. این بررسی ها در طی چند گرانت تحقیقاتی UNDP/World Bank/WHO, از پشتیبانی مالی Special Program for Research and Training in Tropical Diseases برخوردار بوده است.

References

1- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniases. Lancet. 2005 Oct29 Nov4; 366(9496): 1561-77.
2- Clancy Jr J. Delayed type hypersensitivity (DTH) In: Basic concept in immunology. 1nd ed. New York: The McGraw-Hill Companies, 1998: 125-37.
3- Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J. Type IV or delayed-type hypersensitivity (DTH) In: Immunology. 1nd ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2003: 382-8. 4- Montenegro J. A cutis reacao na leishmaniose. Ann Far Med Sao Paulo. 1926; 1: 323-30.
5- Mauel J, and Behin R. Leishmaniasis: Immunity, immunopathology and immunodiagnosis. In: Cohen S, Warren KS, Editors. Immunology of Parasitic Infection. 1nd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1982: 312-23.
6- Manson-Bahr PEC. Diagnosis. In: Peters W, Killick-Kendrick R, Editors. The leishmaniases in biology and medicine, vol. 2, clinical aspects and control. London: Academic Press; 1987: 703-29.
7- Manson-Bahr PEC. Immunity in Kala-azar. Trans Roy Soc Trop Med Hyg. 1961 Nov; 55: 550-5.
8- Pampiglione S, Mansom-Bahr PEC, La Placa M, Borgatti MA, Musumeci S. Studies on Mediterranean leishmaniasis, 3 The leishmanin skin test in Kala-azar. Trans Roy Soc Trop Med Hyg. 1975; 69(1): 60-8.
9- Bahar K, Dowlati Y, Shidani B, Alimohammadian MH, Khamesipour A, Ehsasi S and et al. Comparative safety and immunogenicity trial of two killed Leishmania major vaccines with or without BCG in human volunteers. Clin Dermatol. 1996 Sep-Oct: 14(5): 489-95.
10- Alimohammadian MH, Khamesipour A, Darabi H, Firooz AR, Malekzadeh S, Bahonar A, et al. The role of BCG in human immune responses induced by multiple injections of autoclaved Leishmania major as a candidate vaccine against leishmaniasis. Vaccine. 2002 Dec, 21; 21(3-4): 174-80.
11- Satti IN, Osman HY, Daifalla NS, Younis SA, Khalil EA, Zijlstra EE and et al. Immunogenicity and safety of autoclaved Leishmania major plus BCG vaccine in healthy Sudanese volunteers. Vaccine. 2001 Feb; 19(15-16): 2100-6.
12- Sharifi I, Fekri AR, Aflatonian MR, Khamesipour A, Nadim A, Mousavi MRA, et al. Randomised vaccine trial of a single dose of killed Leishmania major plus BCG against anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Bam, Iran. Lancet. 1998 May; 351(9115):1540-3.
13- Momeni AZ, Jalayer T, Emamjomeh M, Khamesipour A, Zicker F, Labaf Ghassemi R, et al. A randomised, double-blind, controlled trial of a killed L. major vaccine plus BCG against zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. Vaccine. 1999 Feb 5; 17(5): 466-72.
14- Mayrink W, Da Costa CA, Magalhaes PA, Melo MN, Dias M, Oliveira- Lima A, et al. A field trial of a vaccine against American dermal leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1979; 73(4): 385-7.
15- Mayrink W, Williams P, Da Costa CA, Magalhaes PA, Melo MN, Dias M, et al. An experimental vaccine against American dermal leishmaniasis. Experience in the State of Espirito Santo, Brazil. Ann Trop Med Parsitol. 1985 Jun; 79 (3): 259-69.
16- Weigle KA, Santrich C, Martinez F, Valderrama L, and Saravia NG. Epidemiology of cutaneous leishmsniasis in Colombia: A longitudinal study of the natural history, prevalence and incidence of infection and clinical manifestations. J Infect Dis. 1993 Sep; 168(3): 699-708.
17- Souza WJS, Sabroza PC, Santos CS, de Souza E, Henrique MF, and Countinho SG. Montenegro skin tests for American cutaneous leishmaniasis carried out on school-childern in Rio de Janeiro, Brazil: an indicator of transmission risk. Acta Trop. 1992Dec; 52(2-3): 111-9.
18- Weigle KA, Santrich C, Martinez F, Valaderrama L, Saravia NG. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Colombia: environmental and behavioural risk factors for infection, clinical

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-04-11]

manifestations and pathogenicity. J Infect Dis. 1993Sep; 168(3): 709-14.
19- TDR, WHO. Leishmaniasis. In: Tropical Disease Research. Progress 1992, Eleventh pogramme Report, Geneva: UNDP/World Bank/WHO, Special Programme for Research and Training in Tropical Diseaes; 1993: 77-87.
20- Sokal JE. Measurement of delayed skin-test responses. N Engl J Med. 1975; 293: 501-2.
21- Weigle KA, Valderrama L, Arias AL, Santrich C, Saravia NG. Leishmanin skin test standardization and evaluation of safety, dose, storage, longevity of reaction and sensitization. Am J Trop Med Hyg. 1991 Mar; 44(3): 260-71.
22- Zijlstra EE and El-Hassan AM. Leishmanin and tuberculin sensitivity in leishmaniasis in the Sudan, with special reference to kala-azar. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1993Jul; 87 (4): 425-7.
23- Akuffo H, Darce M, Maasho K, Berhan TY. In vivo evaluation of immune response in leishmaniasis: The use of cross-species leishmanin preparations for skin testing. Am J Trop Med Hyg. 1995Jul; 53(1): 16-22.
24- Alimohammadian MH, Kivanjah M, Pak F, Gasnavi A, Kharazmi A. Evaluation of the efficacy of Iran leishmanin and comparison with leishmanins form Wellcome (UK) and Roma(Italy) in cured cutaneous leismaniasis patients. Trans Roy Soc Trop Med Hyg. 1993Sep-Oct; 87(5): 550-1.
25- Kamil AA, Khalil EAG, Musa AM, Modabber F, Mukhtar MM, Ibrahim ME et al. Alum-precipitated autoclaved Leishmania major plus bacilli Calmette-Guerrin, a candidate vaccine for visceral leishmaniasis: safety, skin-delayed type hypersensitivity response and dose finding in healthy volunteers. Trans Soc Trop Med Hyg. 2003May-Jun; 97(3): 365-8.
26- Agwale S, Duhlinska DD, Grimaldi Jr G. Response to heterologous leishmanins in cutaneous leishmaniasis in Nigeria- Discovery of a new focus. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998Jan-Feb; 93(1): 23-7.
27- Mahdi M, Elamin EM, Melville SE, Musa AM, Blackwell JM, Mukhtar MM et al. Sudanese mucosal leishmaniasis: isolation of a parasite within the Leishmania donovani complex that differs genotypically from L. donovani causing classical visceral leishmaniasis. Infect Genet Evol. 2005Jan; 5(1): 29-33.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-04-11]