

تغییرات هیستوپاتولوژیک کبد و طحال سگ های مبتلا به لیشمانیوز احشایی ناشی از لیشمانیا اینفانتوم

رامین منوچهری اردکانی^۱، رامین جان نثار^۲، عبدالعلی مشفق^۳، علی پوست فروش^۴، بهادر سرکاری^{۵*}

^۱ دانشگاه علوم پزشکی شیراز، مرکز تحقیقات پایه در بیماری های عفونی، ^۲ دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، دانشکده پزشکی، گروه پاتولوژی،
^۳ دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی، ^۴ دانشگاه علوم پزشکی شیراز، معاونت تحقیقات و فناوری، ^۵ دانشگاه
علوم پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۷/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۰/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: لیشمانیوز احشایی در سگ ها یک مدل مناسب برای مطالعه لیشمانیوز احشایی در انسان است. هدف این مطالعه بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیک کبد و طحال سگ های مبتلا به لیشمانیوز احشایی ناشی از لیشمانیا اینفانتوم بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی نمونه های تهیه شده از کبد و طحال ۱۰ قلاده سگ مبتلا به لیشمانیوز احشایی با نمونه های منفی ۱۰ قلاده سگ عاری از لیشمانیوز احشایی بررسی و مقایسه شدند. نمونه ها پس از تهیه مقاطع بافتی، به روش هماتوکسیلین-اِئوزین و گیمسا رنگ آمیزی شده و با استفاده از میکروسکوپ نوری برای یافتن تغییرات هیستوپاتولوژی ارزیابی شدند.

یافته ها: در مقاطع بافتی طحال سگ های آلوده، در ۴ حیوان (۴۰ درصد) ارتشاح شدید پلاسماسل، در ۵ مورد (۵۰ درصد) حضور مگاکاریوسیت ها که نشان دهنده خون سازی خارج از مغز استخوان است، در یک حیوان (۱۰ درصد) واکنش التهابی گرانولوماتوز، در ۳ مورد (۳۰ درصد) آتروفی فولیکول های لنفاوی و از دست رفتن مراکز زایا، در ۴ مورد (۴۰ درصد) هیپرتروفی فولیکول های لنفاوی و هم چنین در یک حیوان حضور اجسام لیشمن به تعداد زیاد مشاهده شد.

نتیجه گیری: لیشمانیوز احشایی می تواند سبب ایجاد تغییرات هیستوپاتولوژی در طحال مبتلایان شود که از عمده ترین این تغییرات می توان به تغییر در اندازه و تعداد فولیکول های لنفاوی، التهاب مزمن، تشکیل گرانولوم و حضور اجسام لیشمن درون ماکروفاژهای طحال اشاره کرد.

واژه های کلیدی: لیشمانیوز احشایی، هیستوپاتولوژی، گرانولوم

مقدمه

لیشمانیوز یکی از مشکلات بهداشتی در بسیاری از کشورهای جهان است به گونه‌ای که سازمان بهداشت جهانی آن را به عنوان یکی از شش بیماری مهم عفونی در سرتاسر دنیا معرفی کرده است (۱). عامل بیماری گونه‌های مختلف تک یاخته‌ای از راسته کتیتوپلاست داران به نام لیشمانیا می‌باشد. این انگل برحسب محیط زندگی به دو فرم آماستیگوت و پروماستیگوت دیده می‌شود. در داخل سلول‌های فاگوسیتیک انسان و دیگر مهره‌داران به شکل آماستیگوت و در خارج سلول در روده ناقلین و در محیط‌های کشت مصنوعی به شکل پروماستیگوت دیده می‌شود (۲).

لیشمانیوز بسته به نوع انگل دارای تظاهرات پوستی، پوستی-مخاطی و احشایی است. نوع احشایی این بیماری که کالآزار نامیده می‌شود، سالانه حدود پانصد هزار نفر را در جهان بیمار نموده و در صورت عدم تشخیص و درمان به موقع می‌تواند سبب مرگ و میر ۹۰ درصد بیماران گردد. تا سال ۱۳۵۵ هجری شمسی کمتر از ۱۲۰ مورد بیماری کالآزار در ایران تشخیص داده شده بود، اما با استفاده از روش‌های سروزولوژی اختصاصی به ویژه ایمونوفلوروسانس، آن زمان به بعد تعداد موارد تشخیص داده شده بیماری به سرعت افزایش پیدا کرد، به قسمی که تا پایان سال ۱۳۷۲ میزان موارد مشخص کالآزار به حدود ۵۵۴۹ نفر رسید و به عنوان یکی از بیماری‌های مهم کشور به شمار آمد (۳).

مخازن حیوانی این انگل سگ و سگ‌سانان وحشی مانند؛ روباه، شغال و گرگ می‌باشند. ناقلین انگل لیشمانیا را پشه‌های خاکی فلپوتومینه از خانواده پسیکودیده تشکیل می‌دهند که در حال حاضر ۱۹ گونه از حدود ۷۰۰ گونه شناخته شده آن به عنوان ناقل در نظر گرفته می‌شوند (۴). عامل این بیماری در ایران لیشمانیا اینفانتوم است. تاکنون در استان‌های اردبیل، فارس، بوشهر، آذربایجان شرقی و قم این بیماری به صورت آندمیک گزارش شده و در سایر مناطق کشور به صورت اسپورادیک دیده شده است (۵ و ۶).

با توجه به مرگ و میر بالای بیماری لیشمانیوز احشایی، در صورت عدم تشخیص و درمان به موقع و تشخیص‌های افتراقی مهم آن از جمله لوسمی، سل ارزنی، تب مالت و آندوکاردیت و نیز شیوع روزافزون بیماری‌های تعدیل کننده سیستم ایمنی و پیچیدگی بیشتر علایم کالآزار در همراهی با آنها، نیاز به تشخیص هر چه دقیق‌تر لیشمانیوز احساس می‌شود. تعیین تغییرات هیستوپاتولوژیک کبد و طحال در اثر ابتلا به کالآزار می‌تواند به این مهم کمک شایانی نماید. از آنجا که لیشمانیوز احشایی در سگ‌ها یک مدل مناسب برای مطالعه لیشمانیوز احشایی در انسان است، این مطالعه با هدف بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیک ایجاد شده در کبد و طحال سگ‌های مبتلا به لیشمانیوز احشایی به وسیله لیشمانیا اینفانتوم انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۰ در دانشگاه علوم پزشکی شیراز انجام شد. نمونه‌های مورد بررسی در این مطالعه شامل؛ نمونه‌های تهیه شده از کبد و طحال ۱۰ قلاده سگ مبتلا به لیشرمانیوز احشایی بودند. سگ‌های آلوده در مطالعه قبلی در سال ۱۳۸۹ که در استان کهگیلویه و بویراحمد انجام گرفت شناسایی شدند (یافته‌های منتشر نشده). در بررسی اولیه این سگ‌ها با روش سرولوژی (تست DAT)^(۱) آلودگی به لیشرمانیوز تشخیص داده شدند. سپس این سگ‌ها که سگ‌های صاحب‌دار بودند کشته شده و از کبد و طحال آن‌ها نمونه تهیه شد. نمونه‌های کبد و طحال مورد نظر پس از انتقال به بخش انگل‌شناسی دانشکده پزشکی شیراز، پس از رنگ‌آمیزی مورد بررسی هیستولوژی و پاتولوژی قرار گرفتند. نمونه‌های منفی از کبد و طحال ۱۰ قلاده سگ در منطقه کازرون تهیه شد. این نمونه‌ها از منطقه‌ای تهیه گردیده بود که عاری از لیشرمانیوز احشایی بود. نمونه‌های منفی نیز پس از رنگ‌آمیزی جهت مقایسه با نمونه‌های مثبت مورد بررسی هیستوپاتولوژی قرار گرفتند.

پس از به دست آوردن نمونه‌های بافت کبد و طحال، قطعاتی به ضخامت ۳ تا ۵ میلی‌متر از بافت را جدا نموده و برای ثابت کردن در بافر خنثی شده فرمالین ۱۰ درصد با حجمی ۲۰ برابر حجم هر قطعه بافتی قرار داده شد.

پس از ثابت نمودن قطعات بافتی مراحل زیر

به ترتیب انجام شد؛ بافت ثابت شده را به مدت یک ساعت در اتانول ۷۰ درصد قرار داده سپس در اتانول ۹۵ درصد به مدت یک ساعت دیگر نگه داشته شد. نمونه‌ها در اولین اتانول خالص سه مرتبه، هر بار به مدت یک ساعت نگهداری شدند. نمونه‌ها با گزیرول پاک شده و پاراتین‌گیری شدند. از نمونه‌ها بلاک پاراتینی تهیه شد و از بلاک‌ها به وسیله دستگاه برش بافتی (میکروتوم) به قطعاتی با ضخامت ۵ میکرومتر برش داده شد. جهت رنگ‌آمیزی ابتدا مقاطع را دپارافینیزه نموده و پس از آب‌گیری با الکل، به مدت ۸ دقیقه با محلول همتاکسیلین، رنگ‌آمیزی شد. پس از آماده شدن نمونه‌ها، برای یافتن تغییرات هیستولوژی و پاتولوژی به دقت در زیر میکروسکوپ نوری مورد مطالعه و بررسی قرار گرفتند. تعدادی از نمونه‌ها با روش گیمسا جهت مشاهده اجسام لیشرمان رنگ‌آمیزی شدند. ابتدا لام‌ها در میدان میکروسکوپی با قدرت پایین (۱۰) و سپس در میدانی با قدرت بیشتر (۴۰ و ۱۰۰) بررسی شده و تغییرات مشاهده شده ثبت شدند.

یافته‌ها

نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده با گیمسا وجود جسم لیشرمان را در این نمونه‌ها مشخص نمود (تصویر ۱). پس از نمونه‌برداری از کبد و طحال و

1-Direct Agglutination Test (DAT)

لیشمانیوز احشایی در سگ‌ها یک مدل مناسب برای مطالعه لیشمانیوز احشایی انسانی است (۹). بر این اساس در این مطالعه تغییرات هیستوپاتولوژیک ایجاد شده در کبد و طحال سگ‌های مبتلا به لیشمانیوز احشایی به وسیله لیشمانیا اینفانتوم بررسی و مقایسه شدند.

در این مطالعه در سه مورد آتروفی فولیکول‌های لنفاوی و از دست رفتن مراکز زایا و نیز در چهار مورد هیپرتروفی فولیکول‌های لنفاوی مشاهده شد که با سایر مطالعه‌های انجام شده در این خصوص همخوانی دارد (۹-۱۱).

در بررسی‌های گذشته ارتشاح بافت طحال به وسیله سلول‌های تک هسته‌ای (لنفوسیت و پلاسماسل) و واکنش التهابی مزمن در طحال سگ‌های آلوده به لیشمانیوز احشایی گزارش شده است (۱۴-۱۲). در بررسی حاضر نیز ارتشاح شدید طحال به وسیله پلاسماسل‌ها در چهار حیوان مشاهده شد.

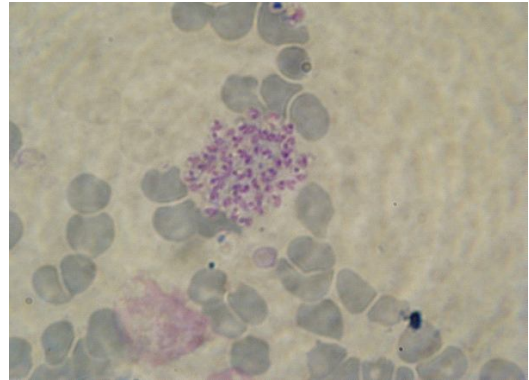
میزان حضور انگل در بافت در طول دوره عفونت با انگل لیشمانیا می‌تواند متفاوت باشد و به عواملی مانند خود ارگانیزم، فاکتورهای میزبان و دفاع سیستم ایمنی بدن میزبان بستگی دارد. در این بررسی تنها در یک مورد اجسام لیشمن به تعداد زیاد درون ماکروفاژهای طحال مشاهده شد. در مطالعات انجام شده در این زمینه درصد بالاتری از آلودگی بافت کبد به انگل لیشمانیا گزارش شده است (۱۰-۱۲).

تهیه لام‌هایی با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، از نظر میکروسکوپی جهت یافتن تغییرات هیستوپاتولوژیک ارزیابی شده و با نمونه‌های کبد و طحال ۱۰ سگ سالم مقایسه شدند. یافته‌های عمده طحال شامل؛ تغییر در شکل و تعداد فولیکول‌های لنفاوی، التهاب مزمن، گرانولوم و حضور جسم لیشمن درون ماکروفاژهای طحال بود. در ۴ حیوان (۴۰ درصد) ارتشاح شدید پلاسماسل‌ها به درون بافت طحال دیده شد (تصویر ۲).

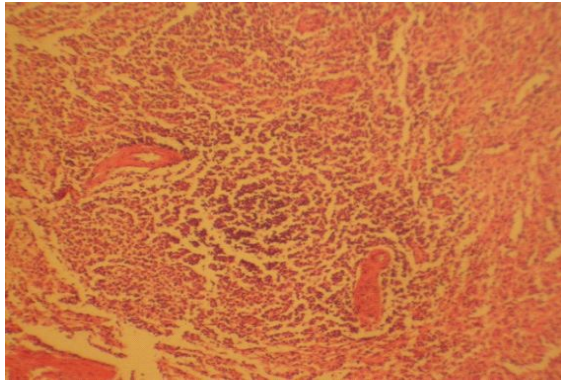
حضور مگاکاریوسیت‌ها که سلول‌های غول‌آسای چندهسته‌ای بوده و نشان دهنده خون‌سازی خارج از مغز استخوان می‌باشد در مورد (۵۰ درصد) و در یک مورد (۱۰ درصد) واکنش التهابی گرانولوماتوز دیده شد (تصاویر ۲ و ۳). در ۳ مورد (۳۰ درصد) فولیکول‌های لنفاوی دچار آتروفی شده و فاقد مرکز زایا بودند. همچنین در ۴ مورد فولیکول‌ها دچار هیپرتروفی شده و بزرگ‌تر از حد طبیعی بودند (تصاویر ۴ و ۵). حضور اجسام لیشمن به تعداد زیاد تنها در یک مورد (۱۰ درصد) از نمونه‌ها مشاهده شد (تصویر ۶). مطالعه مقاطع بافتی کبد هیچ گونه تغییر واضحی را در سگ‌های آلوده به لیشمانیا نشان نداد.

بحث

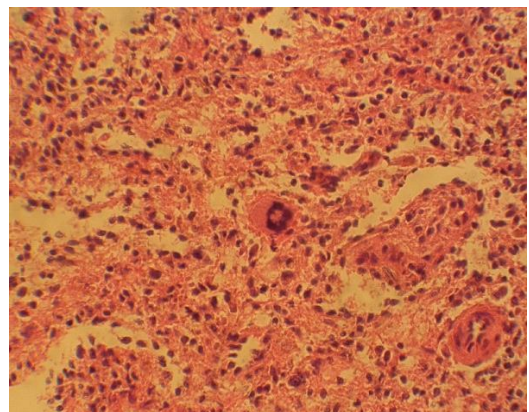
لیشمانیوز احشایی ناشی از لیشمانیا اینفانتوم یکی از بیماری‌های انگلی مهم در کشور ایران است (۸). هدف از این مطالعه، بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیک ایجاد شده در کبد و طحال سگ‌های مبتلا به لیشمانیوز احشایی به وسیله لیشمانیا اینفانتوم بود.



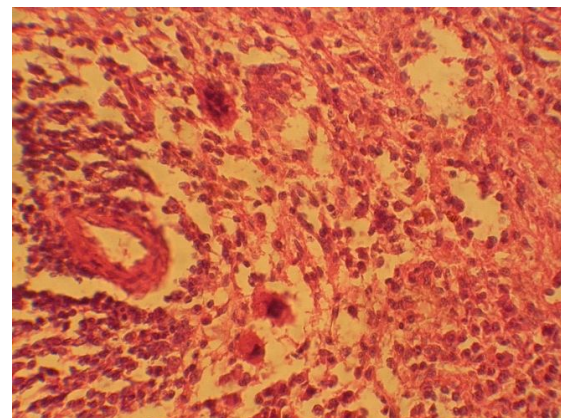
تصویر ۱: حضور اجسام لیثمن در طحال سگ‌های آلوده به لیثمانیا (رنگ‌آمیزی گیمسا، بزرگنمایی ۱۰۰۰، میکروسکوپ نوری)



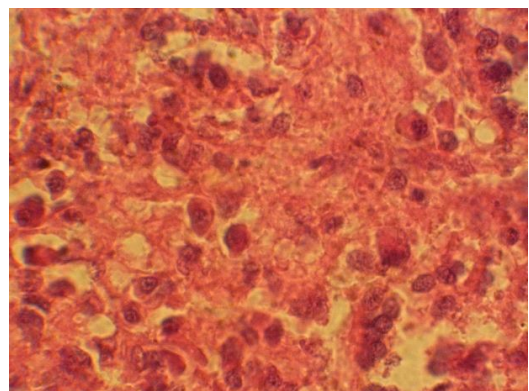
تصویر ۴: فولیکول‌های لنفاوی هیپرتروفیک در بافت طحال سگ‌های آلوده به لیثمانیا (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و انوزین، بزرگنمایی ۴۰۰ میکروسکوپ نوری)



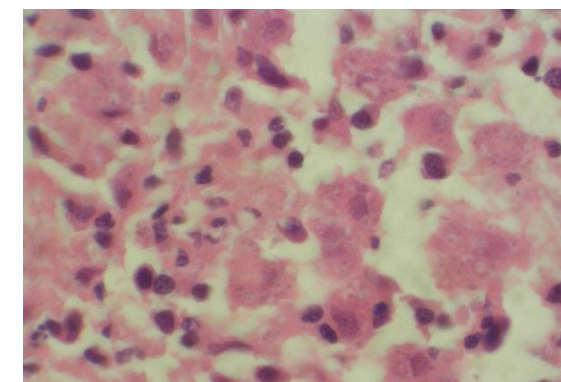
تصویر ۲: ارتشاح پلاسماسل و حضور مگاکاریوسیت در بافت طحال سگ‌های آلوده به لیثمانیا (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و انوزین، بزرگنمایی ۴۰۰، میکروسکوپ نوری)



تصویر ۵: فولیکول‌های لنفاوی آتروفیک در بافت طحال سگ‌های آلوده به لیثمانیا (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و انوزین، بزرگنمایی ۴۰۰، میکروسکوپ نوری)



تصویر ۳: هسته گرانولوما در بافت طحال سگ‌های آلوده به انگل لیثمانیا (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و انوزین، بزرگنمایی ۱۰۰۰، میکروسکوپ نوری)



تصویر ۶: حضور اجسام لیثمن به تعداد زیاد در طحال سگ‌های آلوده به لیثمانیا (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و انوزین، بزرگنمایی ۱۰۰۰، میکروسکوپ نوری)

وجود گرانولوم در بافت کبد از جمله تغییراتی است که ممکن است در آلودگی به لیشمانیا در بافت کبد یا طحال دیده شود. واکنش التهابی گرانولوماتوز در طحال سگ‌های آلوده به لیشمانیا شاگاسی گزارش شده است (۱۵ و ۱۰). در مطالعه حاضر نیز یک مورد گرانولوم در بافت طحال مشاهده شد.

در بررسی حاضر در پنج مورد حضور تعداد زیاد مگاکاریوسیت‌ها که نشانه خون‌سازی خارج از مغز استخوان است دیده شد که در مطالعات قبلی کمتر به آن اشاره شده است. در واقع این مورد می‌تواند نشان دهنده درگیری شدید مغز استخوان به عنوان مکان اولیه خون‌سازی در بدن باشد. زمانی که مغز استخوان نتواند وظیفه خود را انجام دهد و بدن دچار کم خونی شود، طحال به عنوان مکان ثانویه خون‌سازی شروع به فعالیت کرده و این عمل سبب بزرگی طحال شود. یافته‌هایی از جمله التهاب پورت، هیپرتروفی و هیپرپلازی سلول‌های کوپفر، اینترالوبولار گرانولوم و ارتشاح سلول‌های تک هسته‌ای در کبد سگ‌های آلوده به لیشمانیوز گزارش شده است (۱۶ و ۱۵، ۹). در مطالعه حاضر تغییر واضح و مشخصی در کبد سگ‌های مبتلا به لیشمانیا اینفانتوم مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج حاصل از تغییرات هیستوپاتولوژیک طحال در سگ‌های آلوده به لیشمانیوز می‌تواند به عنوان مدل مناسبی از تغییرات

طحال در بیماری لیشمانیوز در انسان باشد. پیشنهاد می‌شود این تغییرات در نمونه‌های بیشتری از سگ‌های آلوده به همراه تغییرات غدد لنفاوی این حیوانات مورد بررسی قرار گیرند تا تابلو بالینی این گونه تغییرات در کبد، طحال و غدد لنفاوی به درستی ترسیم شود.

تقدیر و تشکر

این مطالعه حاصل پایان نامه دکترای پزشکی عمومی بوده است. هزینه‌های این مطالعه از منابع مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شیراز تأمین شد. نویسندگان از زحمات فرزانه ذهبیون تقدیر و تشکر می‌نمایند.

REFERENCES:

1. Shamsi-Meymandi S, Eslam-manesh T, Dabiri SH, Shamsi-Meymandi M, Nadji M. The histopathological changes and immunohistochemical findings of acute, chronic nonlupoid and chronic lupoid types of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Kerman University of Medical Sciences* 1389; 17: 281-96.
2. Daneshbod Y, Oryan A, Davarmanesh M, Shirian S, Negahban S, Aledavood A, et al. Clinical, histopathological and cytologic diagnosis of mucosal leishmaniasis and literature review. *Arch Pathol Lab Med* 2011; 135: 478-82.
3. Edrissian GH, Darabian P. A comparison of enzyme linked immunosorbent assay and IFA test in the sera-diagnosis of cutaneous and visceral leishmania in Iran. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1979; 73: 289-92.
4. Azizi K, Rassi Y, Motazedian MH, Javadian E, Yaghoobi-Ershadi MR, Rafizadeh S, et al. *Phlebotomus* (*Paraphlebotomus*) *alexandri*, the probable vector of visceral leishmaniasis (kala azar) in southern Iran. *Journal of School of Public Health and Institute of Public Health Research* 2006; 4: 39-48.
5. Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, et al. *Harrison's principles of internal medicine*. 17th ed. New York: Mc Graw Hill; 2008; 1296-9.
6. Maleki Ravasan N, Oshaghi MA, Javadian E, Rassi Y, Mohebal M, Sadrai J, et al. Detection and identification of *Leishmania* parasites within sand flies using kDNA, rDNA and CPB loci. *Moddaress Journal of Medical Sciences* 1387; 1: 81-9.
7. Kendrick RK. Canine Leishmaniasis: moving towards a solution. *Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum* 2002; 4: 72-6.
8. Mohebal M, Edrissian GH, Shirzadi MR, Akhoundi B, Hajjaran H, Zarei Z, et al. An observational study on the current distribution of visceral leishmaniasis in different geographical zones of Iran and implication to health policy. *Travel Med Infect Dis* 2011; 9: 67-74.
9. Giunchetti RC, Filho OAS, Carneiro CM, Moyrink W, Marquis MJ, Tafuri WL, et al. Histopathology, parasite density and cell phenotype of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 2008; 121: 23-33.
10. Santana CC, Vassallo J, DE Freitas LAR, Oliveira GGS, Carvalho LCO, Santos WLC. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: A study on naturally infected dogs. *Parasite Immunol* 2008; 30: 515-24.
11. Lima WG, Michalick MSM, Melo MN, Tafuri WL, Tafuri WL. Canine visceral leishmaniasis: A histopathological study of lymph nodes. *Acta Trop* 2004; 92: 43-53.
12. Toplu N, Ajdogan A. An immunohistochemical study in cases with usual and unusual clinicopathological findings of canine visceral leishmaniasis. *Parasitol Res* 2009; 436: 1-7.
13. Natami A, Sahibi H, Lasri S, Boudouma M, Idriissi NG, Rhalen A. Serological, clinical and histopathological changes in naturally infected dogs with leishmania infantum in the Khemisset province, Morocco. *Vet Res* 2000; 31: 355-65.
14. Moreno AM, Cruz MSM, Blanco A, Rodriguez H. Immunological and histological study of T- and B-lymphocyte activity in canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 1993; 51: 49-59.
15. Tafuri WL, Oliveira MR, Melo MN, Tafuri WL. Canine visceral leishmaniasis: A remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Vet Parasitol* 2001; 96: 203-12.
16. Gonzalez JL, Rollan E, Novoa C, Castaro M. Structural and ultrastructural hepatic changes in experimental canine leishmaniasis. *Histol Histopathol* 1988; 3: 323-29.

Histopathological Changes in Liver and Spleen of Canine Visceral Leishmaniasis Due to *Leishmania Infantum*

Manochehri Ardakani R¹, Jannesar R², Moshfe AA³, Postforosh A⁴, Sarkari B^{5*}

¹Faculty of Medicine, Center for Basic Researches in Infectious Diseases, Shiraz, Iran, ²Department of Pathology, Faculty of Medicine, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, ³Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, ⁴Office of vice chancellor for research and technology, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran, ⁵Department of Parasitology & Mycology, Faculty of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Received: 15 Oct 2011 Accepted: 11 Jan 2011

ABSTRACT

Background & Aim: Visceral leishmaniasis in dogs is an excellent model for studying visceral leishmaniasis in humans. The current study was designed to study the histopathological changes in liver and spleen of dogs with visceral leishmaniasis, due to *Leishmania infantum*.

Methods: In this experimental study, liver and spleen samples from ten dogs with visceral leishmaniasis were compared with normal liver and spleen samples of ten dogs from non-endemic area. Liver and spleen tissue samples were stained by hematoxylin and eosin and also by Giemsa methods after tissue processing. Finally, using optical microscope, samples were carefully analyzed for finding any histopathological changes.

Results: In spleen of infected dogs, in four cases (40%) severe infiltration of plasma cells, in five cases (50%) presence of megakaryocytes indicating extramedullary hematopoiesis, in one case (10%) inflammatory granulomatous reaction, in three cases (3%) atrophy of lymphoid follicles and loss of germinal centers, in four cases (40%) lymphoid follicles hypertrophy and also in one case (10%), the presence of Leishman bodies in large scale were observed. Liver tissue sections showed no significant changes.

Conclusion: Visceral leishmaniasis can cause histopathological changes in spleen and among them the changes in the size and number of lymphoid follicles, chronic inflammation, granuloma formation and presence of Leishman bodies in spleen macrophages could be mentioned.

Key words: Visceral leishmaniasis, Histopathology, Granuloma

*Corresponding Author: Sarkari B, Department of Parasitology & Mycology, Faculty of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
Email:sarkarib@sums.ac.ir