بررسی پاسخهای ایمونولوژی سیستم دفاعی میزبان (انسان) علیه پادگنهای Ascaris lumbricoides

مهدی شریف (Ph.D.) *

چکیده

سابقه و هدف : در این تحقیق تلاش گردید تا جنبه های مختلف تأثیر پادگنهای Ascaris lumbricoides بر بدن انسان و واکنش میزبان در مقابل مراحل مختلف آلودگی از طریق تعیین میزان ائوزینوفیلی؛ تشخیص وجود پادتن و تعیین میزان آن و نیز الکتروفورز گلوبولینهای سرم مورد مطالعه قرار گیرد.

مواد و روش‌ها : این مطالعه بر روی ۱۲۰ فرد آلوده به انگل Ascaris lumbricoides از ساکنین روستای خیرآباد اصفهان با میانگین ۵ ± ۲ با استفاده از روش ایمونوفلوئورسانس غیر مستقیم و لارو مرحله دوم به عنوان پادگن و نیز الکتروفورز گلوبولینهای سرم و گسترش خون انجام شد. جهت آنالیز آماری نتایج از آزمون t-test استفاده گردید.

نتایج : در این مطالعه؛ بیشترین میزان ائوزینوفیلی (۷۶٪) در ۴ بیمار و کمترین میزان آن (۱٪) در ۶ یمار مشاهده گردید. بیشترین تعداد افراد مبتلا، ائوزینوفیلی بین ۱۶-۱ درصد را نشان دادند.

از بین ۱۲۰ فرد آلوده؛ ۸۵ نفر (۷۰٪) دارای پادتن با رقتهای (۱:۲۰ تا ۱:۳۲۰) بوده و ۳۵ نفر فاقد آن بودند. با الکتروفورز؛ نمونه های سرم افرادی که با روش ایمونوفلوئورسانس دارای عیار پادتن بودند افزایش قابل ملاحظه گلوبولین گاما را نسبت به سرمهای فاقد عیار پادتن نشان دادند ($P<0.0001$). میزان گلوبولینهای آلفا-۱ و آلفا-۲ و بتا در هر گروه مثبت و منفی متغیر بوده و اختلاف قابل بررسی نداشت.

استنتاج : نتایج نشان می دهد که افزایش سطح ائوزینوفیل و نیز تولید پادتن موقتی بوده و روش ایمونوفلورسانس نباید اساس تشخیص آلودگی با A.lumbricoides قرار گیرد.

واژه های کلیدی : Ascarus limbricoides ، ائوزینوفیلی، الکتروفورز، ایمونوگلوبولین

مقدمه

A.lumbricoides یکی ازشایعترین کرمهای انگلی دستگاه گوارش انسان است (۴،۳،۲،۱) و عفونت ناشی از آن علیرغم استفاده از داروها و اعمال موازین پیشگیری؛ در بسیاری از نقاط جهان از شایعترین عفونتها میباشد (۴،۳،۲).

درعفونت با آسکاریس اشکال مختلفی ازواکنشهای آلرژیک ظاهر میشود. در افرادی که آلوده می شوند، پادگنهای مرحله لاروی انگل میتواند منجر به تولید واکنشهای پوستی؛ ائوزینوفیلی؛ سندرم لوفلر و سایر واکنشهای شدیدپاتولوژیک گردد(۵). لارواسکاریس در

* عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی مازندران- فوق تخصص عفونی کودکان

✉ ساری- بلوار پاسداران- مرکز آموزشی درمانی بوعلی سینا

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-21]

طی مهارجرت از ارگانهای مختلف از قبیل روده؛ کبد؛ و ریه ها عبور میکند. بیندسیل (به کبد Bindseil,1990) نشان داد که روده در جلوگیری از مهاجرت لارو را A.suum نقش مهمی ایفا مینماید و در خوکهائی که سابقه عفونت با حدود A.suum داشتند کاهش حدود (۵۰٪) در تعداد لارو موجود در کبد مشاهده گردید. پاسخ ایمنی بافت ریه در میزبانان مصون؛ به دلیل ظهور واکنش ازدیاد حساسیت فوری که منجربه تولید ادم و آمفیزم گردیده و نیز تهاجم سریع سلولهای التهابی از قبیل ائوزینوفیل بلافاصله پس از ورد لارو به ریه؛ قابل ردیابی نمی باشد(۶). مطالعات متعدد، تولید پادتن را در آلودگی باگونه هایAscaris جوندگان نشان داده است. پادتن های تولید شده در این حیوانات شامل کلاسها و زیرکلاسهای ایمونوگلوبولین ها می باشد(۷). استرومبرگ (Stromberg, 1989) ماده ای را از پوست اندازی مرحله سوم به مرحله چهارم لارو آسکاریس جدا نمود که شدیداً آلرژن بوده و هنگامی که به خوکچه هندی به صورت داخل صفاقی تزریق میشدموجب تحریک تلوید مقدار قابل توجهی پادتن Ig E میگردید(۸). کوششهای زیادی جهت نشان دادن انتقال غیرفعال مصونیت با استفاده از سرم صورت گرفته است. خاری و همکاران (Khaury et al, 1987) با استفاده از خوکچه هندی نشان دادند که Ig E و IgG1 موجود در سرم حیوان مصون میتواند مصونیت غیرفعال تولید نماید(۹).

باتوجه به شیوع بالایA.lumbricoides در بسیاری از روستامهای کشور؛ انجام تحقیق در زمینه جنبه های مختلف تأثیر A.lumbricoides بر بدن؛ به ویژه بر سیستم ایمنی و میزان تحریک پادگنهای کرم در تولید پادتن از اهمیت ویژه ای برخوردار است زیرا میتواند به عنوان گامهای اولیه در مطالعات ایمونوفوژیک انگلها و احتمالاً در تولید واکسن مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش ها

دراین مطالعه؛۱۲۰ فردآلوده به آسکاریس از اهالی روستای خیرآباد اصفهان مورد بررسی قرار گرفتند.

روش‌نمونه‌گیری مبتنی بر هدف بوده است. برای تشخیص افرادآلوده؛ قوطی های مخصوص در اختیار افراد مذکور قرارمی‌گرفت و سپس با روشهای مستقیم، فلوتاسیون و فرمل- اتر در آزمایشگاه انگل شناسی دانشکده پزشکی اصفهان موردمطالعه میکروسکوپی قرار میگرفتند.

ازافرادموردمطالعه برای انجام آزمایش سرم شناسی وخون شناسی؛ خونگیری به عمل می‌آمد و سرمها تا زمان‌انجام آزمایش در حرارت -۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری‌میشد.

آزمایشات خون شناسی : از خون افراد آلوده گسترش نازکی‌تهیه می شد وپس ازثبوت با اتانل؛ با گیمسا رنگ‌آمیزی‌شده و ازنظر ائوزینوفیلی مورد مطالعه قرارمیگرفت. بالاتراز ۴ درصد ائوزینوفیل خون به عنوان افزایش ائوزینوفیل (ائوزینوفیلی) در نظر گرفته شد.

آزمایش سرولوژی(ایمونوفلوئورسانس غیرمستقیم): آنتی‌ژن مورد استفاده در این روش لاروهای خارج شده از تخم‌بود که با استفاده از سفیده تخم مرغ رقیق شده با بافر فسفاته (۱: ۵) به سطح لام میچسبید . برای بدست آوردن مقادیرزیاد تخم انگل به عنوان پادگن به منظور انجام آزمایش سرم‌شناسی؛ شربت پیپرازین سیترات و راهنمائی لازم در زمینه‌چگونگی مصرف داروجهت دفع کرم در اختیار آنان قرار می‌گرفت . ضمناپ به هر نفر یک سطل پلاستیکی جهت‌جمع‌آوری مدفوع ۲۴-۴۸ ساعته داده می شد. سپس مجدداً برای گرفتن سطلهای حاوی آسکاریس‌های دفع شده به محل سکونت افراد مراجعه نموده و کرمها درظروف شیشه‌ای دردار جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل می‌شد. سپس کرمهای ماده پس از شستشو با آب مقطر و سرم فیزیولوژی؛

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-21]

تشریح ورحم آنها جدا گردیده و در یک پلیت حاوی آب معمولی له‌می شد تا تخمها از رحم جدا شوند. پس ازگذشت حدود دوهفته که لارو در درون تخم تشکیل می‌شد؛ آب حاوی تخم‌لاروه شده در یک فلاسک شیشه ای ریخته شده وبا اضافه‌کردن گلوله های شیشه‌ای به آرامی تکان داده می شد تا لارو ازدرون تخم آزاد شود و در آزمایش سرم شناسی مورد استفاده قرار گیرد.

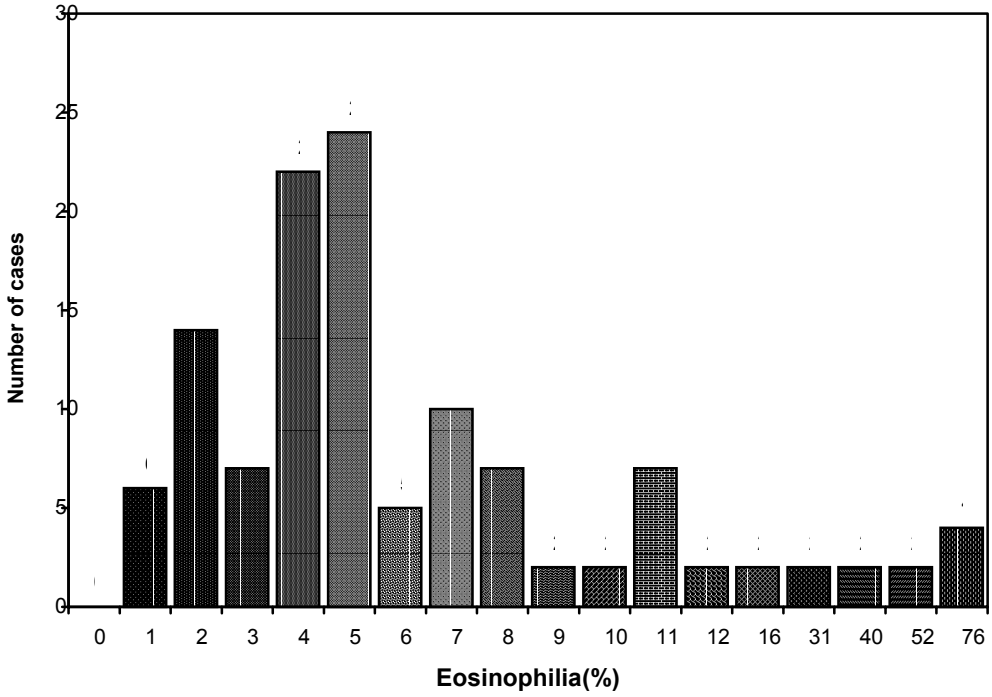
در این مطالعه از ۱۷ نمونه سرم نوزاد که به عنوان کنترل‌منفی آزمایش شده بودند ۲ نمونه با رقت ۱۰ :۱ مثبت شده‌بود در حالیکه با رقت ۲۰ :۱ سرم هیچیک از نوزادان مثبت‌نشد. به همین دلیل رقت ۲۰ :۱ به عنوان عیار مرزی (Borderline) انتخاب گردید.

الکتروفورز سرم :

برای مطالعه میزان گلوبولین‌های سرمهای مورد آزمایش از الکتروفورز سرمها بر روی استات سلولز استفاده شد . در این‌روش با استفاده از بافر باربیتورات و ولتاژ ۱۸۰ و زمان ۱۵دقیقه الکتروفورز انجام شده و سپس توسط Cilin scan - 2 اسکن می گردید . مطالعه مقطعی بوده و از t - test برای آنالیزآماری نتایج استفاده شد.

نتایج

نتایج آزمایش خون ۱۲۰ فرد آلوده به آسکاریس از نظرمیزان ائوزینوفیل در نمودار شماره ۱ ارائه گردیده است .همانگونه که در نمودار شماره ۱ مشاهده میشود بیشترین‌میزان ائوزینوفیل (۷۶٪) در ۴ بیمار و کمترین میزان درصدائوزینوفیل (۱٪) در ۶ نفر مشاهده شد . بیشترین تعداد افرادآلوده ائوزینوفیلی ۱۶ - ۱ درصد را نشان دادند .

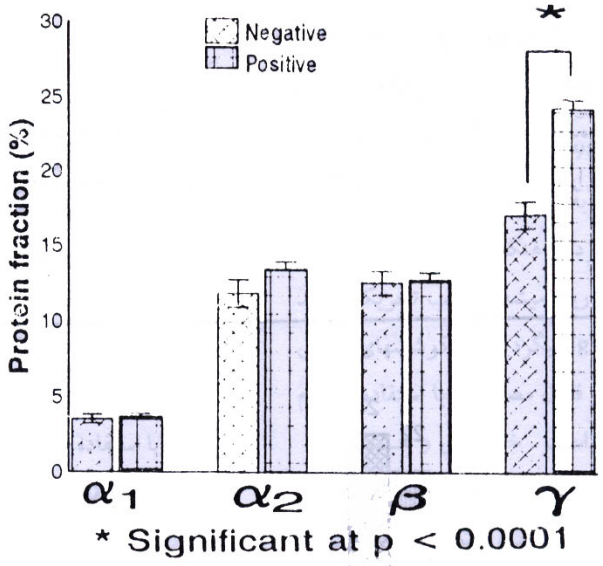


نمودار شماره ۱ : درصد ائوزینوفیل در ۱۲۰ فرد آلوده به A.lumbricoides در روستای خیرآباد اصفهان

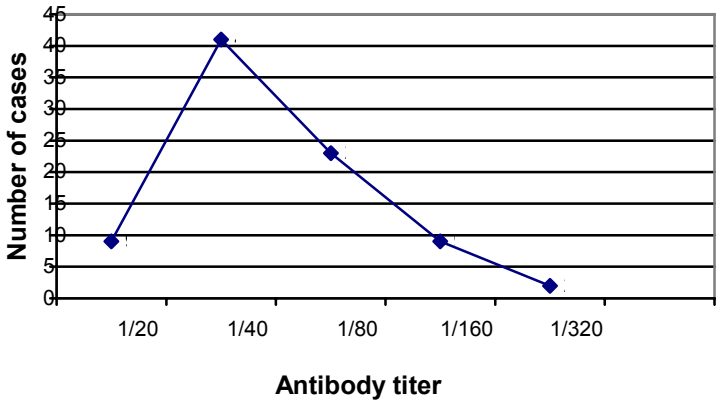
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-21]

نتیجه الکتروفورز سرم خون افراد آلوده برای تعیین اجزاءپروتینی آلفا۱- ، آلفا۲ ، بتا و گاما در نمودار شماره ۲ ارائه‌شده است. سرم افرادی که با روش ایمونوفلوئورسانس دارای‌عیار پادتن بودند افزایش قابل ملاحظه گلوبولین گاما را نسبت‌به سرمهای فاقد عیار پادتن نشان دادند ($P < 0.0001$)میزان‌آلفا۱- ، آلفا۲- و بتا در هر دو گروه مثبت و منفی متغیر بوده‌و اختلاف معنی داری نداشت

رم افراد آلوده به آسکاریس از نظر وجود پادتن به روش‌ایمونوفلوئورسانس آنتی بادی غیر مستقیم مورد مطالعه قرارگرفت که نتایج حاصله در منحنی شماره ۱ آمده است .همانگونه که در این منحنی ملاحظه میگردد بیشترین تعدادافراد آلوده دارای تیتر ۴۰ :۱ بوده و تنها دو نفر دارای تیتر۳۲۰ :۱ بودند. جمعاً ۳۵ نفر فاقد عیار پادتن بودند.



نمودار شماره ۲ : مقدار درصد فراکسیونهای پروتئین در سرم افراد آلوده به A.lumbricoides در روستای خیرآباد اصفهان.



منحنی شماره ۱ : عیار پادتن با روش (I.F.A) در سرم ۱۲۰ افراد آلوده به A.lumbricoides در روستای خیرآباد اصفهان.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-21]

بحث

در این تحقیق ۷۱ نفر (۵۹٪) ائوزینوفیل بالاتر از ۴ درصد را نشان دادند . افزایش میزان ائوزینوفیل در آسکاریس‌معمولا موقتی بوده و بالاترین میزان آن سه هفته پس ازآلودگی ودرطی مهاجرت لاروظاهر میگردد (۱۰)؛ ولی دربیمارانی که دارای کرم بالغ آسکاریس میباشند ؛ ائوزینوفیلی‌جزئی بوده و یا اصلا وجود ندارد (۱۰). ائوزینوفیلی ولوکوسیتوز یافته‌های آزمایشگاهی عفونت با Toxocara canisدر انسان و حیوان و بخصوص درمرحله مهاجرت لارو آن‌هستند(۱۰). با توجه به نمودار شماره ۱ افزایش ائوزینوفیل‌میتواند نشانگر عکس العمل‌های آلرژیک در نتیجه مهاجرت‌لارو انگل در افراد مبتلا به A. lumbricoidesو سایر انگلهاباشد . افراد مورد مطالعه در معاینات بالینی از نظر بیماریهای دیگر سالم بوده اند. آلرژی می‌تواند دلیل دیگر افزایش ائوزینوفیل باشد . همچنین با توجه به تحقیقات به عمل آمده‌توسط محققین مختلف در رابطه با لاروهای مهاجر احشایی‌در انسان و حیوان (۱۰) به نظر میرسد یکی دیگر از علل بالابودن میزان درصد ائوزینوفیل در چند فرد مورد مطالعه‌مهاجرت لارو کرمهایی چون T. canis در انسان باشد که‌متأسفانه به علت عدم وجود مدارک کافی در این زمینه درکشور ما اطلاع کافی در این مورد در دست نیست . به غیر از ۴مورد ائوزینوفیلی بالا در بقیه موارد میانگین ائوزینوفیلی ۵/۵درصد بوده است که احتمالا نشان دهنده آلودگی افراد موردمطالعه به کرم بالغ و نه مرحله لاروی آن است .

در این بررسی ارتباطی بین میزان ائوزینوفیلی و عیارپادتن دیده نشد. این موضوع با یافته جونز در سال ۱۹۷۷(Jones, 1977)که معتقد بود ارتباطی بین این دو در مطالعه‌انجام شده توسط وی وجود نداشته ، مطابقت دارد(۱۱).

با الکتروفورز پروتئین سرم افراد آلوده نشان داده شد که درافرادی که با روش ایمونوفلورسانس دارای تیتر بالایی ازآنتی‌بادی هستند پروتئین‌های منطقه گاما افزایش می یابد. هیپرگاماگلبولینمی در اثر عفونت با لاروهای مهاجر احشائی‌توسط محققین مختلف گزارش شده است (۱۲و۱۳). درآزمایش انجام شده توسط جلایر (Jalayer 1969) در غنامیزان گلبولین در همه سرمهای مورد مطالعه (مثبت و منفی)بالا بوده است و تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین سرمهای مثبت‌وکنترل مشاهده نشده است که این ممکن است به علت تولید آنتی‌بادیهای قبلی در اثر عفونتهای دیگر که بطور آندمیک درمنطقه وجود دارند، باشد(۱۴).دراین مطالعه الکتروفورزسرم‌های دارای عیار پادتن (مثبت) افزایش قابل ملاحظه‌گلبولین گاما را نسبت به سرمهای فاقد عیار پادتن (منفی)نشان داد که با آزمون آماری اختلاف معنی داری در این دوگروه مشاهده گردید ($P < 0.0001$) ولی میزان گلوبولین‌های‌آلفا۱، آلفا۲ و بتا درهر دوگروه منفی و مثبت متغیربود.میزان بالای گلبولین گاما می‌تواند در ارتباط با افزایش پادتن وشاید تا حدودی نیز نشانگر کارایی روش ایمونوفلوئورسانس در تشخیص این آلودگی باشد.

نتایج بدست آمده نشان داد که از ۱۲۰ نمونه سرم ؛ ۸۵نمونه (۷۰٪) نتایج مثبت داشته و ۳۵ نمونه (۳۰٪) نیز منفی‌بوده است . دلایل احتمالی این امر را بطور خلاصه میتوان چنین بیان داشت : از سابقه افراد مورد مطالعه اطلاعی در دست نبوده و مشخص نیست که برای بار اول آلوده شده‌اند یاعفونتهای مکرر در آنها صورت گرفته است ؟ به عبارت دیگرآیا عفونت های بعدی موجب بالا رفتن عیار بوده است یاخیر؟ آیا علاوه بر وجود کرم بالغ ؛ مرحله لاروی انگل نیز درآنها موجود بوده است یا خیر ؟ و بالاخره چه مدتی از زمان‌آلودگی

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-21]

در فرد گذشته است ؟ نتایج بدست آمده از مطالعات‌انجام شده توسط لج‌کینا ، (Lejkina , 1974) بیانگر آن است‌که ۵-۱۰ روز پس از آلودگی با لارو آسکاریس پادتن در خون‌تولید شده و ۹۰-۱۰۰ روز باقی میماند(۱۵).

با توجه به سایر تحقیقات ؛ می توان چنین بیان نمود که علت منفی شدن سرمهای موردمطالعه دراین بررسی ؛ عدم وجود مرحله لاروی کرم در این عده ؛ آلودگیهای قبلی وجلوگیری ازمهاجرت مجددلاروها در آلودگیهای بعدی و درنتیجه جلوگیری از تحریک سیستم ایمنی و تولید پادتن وبالاخره وجود تعداد کم کرم بالغ در آنها میباشد . شاید این‌موضوع یکی از دلایلی بوده است که میزان پادتن در سرم‌خون افراد آلوده در حد قابل تشخیص نباشد زیرا سوابق افرادآلوده در این بررسی در دسترس نبوده است .

تقدیر و تشکر

بطور کلی گذشته از جنبه تحقیقی این بررسی نتایج به‌دست آمده نشان داد که با روش ایمونوفلوئورسانس و استفاده‌از لارو مرحله دوم. A.lumbricoides بعنوان پادگن؛ سرم۳۰درصد افراد آلوده نتایج منفی داده است . بنابراین روش مذکوررا نباید اساس تشخیص آلودگی قرار دادبلکه میتواندفقط دربررسیهای سرواپیدمیولوژیک برای تشخیص حدود ۷۰درصد موارد آلوده مورد استفاده قرار گیرد

فهرست منابع

1. Arffa , F. ; Ghadiran , E . Epidemiology and masstreatment of ascariasis in six rural communities inCentral Iran. Am. J. Trop. Med. Hyg, 1977; 26:866
2. Dagnew , M. ; Hailu , T . Intensity of infection andreinfection rate of Ascaris lumbricoides in ruralfarming village, Dembia district, NorthwestEthiopia. Ethiopia. Med. J. 1996;33(4):243-9
3. Gbakima , AA. ; Sahr , F. , Intestinal parasiticinfection among rural farming communities ineastern Sierraleon. Afr. J. Med. Sci .1995 ; 24(2):195-200
4. Sugunan , A.P. ; Murhecar , M.V. Intestinalparasitic infection among different populationgroups of Andaman and Nicobar Islands. J. Commun. Dis. 1996; 28(4):253-9
5. Yazicioglu , M. , Ones,U. ; Yalcin . Peripheral andnasal eosinophilia and serum total immunoglobulinE level in children with ascariasis. Turk. J. Pediatr. 1996; 38(4):477-84
6. Bindseil , E. Immunity to Ascaris suum. Theimportance of the gut for immunity in mice. Acta.Pathol. Micro. Scand. 1980; 78:183
7. Strejan , G. and Campbell , D. H. Hypersensitivityto Ascaris antigens. Production of homocytotropicantibodies in rat. J. Immunol. 1988; 101: 628
8. Stromberg , B. E . Ig E and Ig G antibody productionby a soluble product of Ascaris suum in guinea pigs.Immunology 1989; 39:489
9. Khaury , P.B ; Stromberg , B.E. ; Soulsby ,E.J.Immune mechanisms of Ascaris

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-21]

suum in inbredguinea pigs : Passive transfer of immunity by cellsor serum. Immunology 1987; 2: 205

10. Brown , H.W. , and Neva , F. , Basic clinicalparasitology,5th Edition. Appleton & Lange,Singapore. 1993:132-136
11. Jones , H.I. Haemagglutination tests in the studyof Ascaris epidemiology . Ann. Trp. Parasitol. 1977; 71(2):219-226
12. Huntley,C.C. , Moreland,A.Gel diffusion studieswith Toxocara and Ascaris extract. Am. J. Trop.Med. Hyg. 1992; 12:204
13. Soulsby , E.J. Immunization against Ascarislumbricoides in the guinea pigs. Nature 1992;179: 383
14. Jalayer , T. Studies on Toxocara canis and viscerallarva migrans. Ph.d. Thesis. 1969
15. Lejkina,E.S. ; Guseinor.G.A. Results ofapplication of serological reactions in determinationof the stage of ascariasis. Med. Paraziter. Bolezni. 1974; 23:79

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-21]