

بررسی پاسخهای ایمنولوژی 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 روش ها : این مطالعه بر روی ۱۲۰ فرد آلوده به انگل *Ascaris lumbricoides* از ساکنین روستای خیرآباد اصفهان با میانگین 5 ± 2 با استفاده از روش ایمنوفلوروسانس 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 بیمار 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 رتتهای (۱:۲۰ تا ۱:۳۲۰) بوده و ۳۵ نفر فاقد آن بودند. با الکتروفورز؛ نمونه های سرم افرادی که با روش ایمنوفلوروسانس 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 ایمنوفلوروسانس نباید اساس تشخیص آلودگی با *A. lumbricoides* قرار گیرد.

واژه های کلیدی : *Ascaris lumbricoides*، ائوزینوفیلی، الکتروفورز، ایمنوگلوبولین

مقدمه

در عفونت با آسکاریس اشکال مختلفی از واکنشهای 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 شدید پاتولوژیک گردد (۵). لارواسکاریس در

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

✉ ساری- بلوار پاسداران- مرکز آموزشی درمانی بوعلی سینا

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

مواد و روش ها

در این مطالعه ۱۲۰ فرد آلوده به آسکاریس از اهالی روستای خیرآباد اصفهان مورد بررسی قرار گرفتند.

روش نمونه‌گیری مبتنی بر هدف بوده است. برای تشخیص افراد آلوده؛ قوطی‌های مخصوص در اختیار افراد مذکور قرار می‌گرفت و سپس با روشهای مستقیم، فلوتاسیون و فرمل- اتر در آزمایشگاه انگل شناسی دانشکده پزشکی اصفهان مورد مطالعه میکروسکوپی قرار می‌گرفتند.

از افراد مورد مطالعه برای انجام آزمایش سرم شناسی و خون شناسی؛ خونگیری به عمل می‌آمد و سرمها تا زمان انجام آزمایش در حرارت ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری میشد.

آزمایشات خون شناسی : از خون افراد آلوده گسترش نازکی تهیه می‌شد و پس از ثبوت با اتانل؛ با گیمسا رنگ آمیزی شده و از نظر ائوزینوفیلی مورد مطالعه قرار می‌گرفت. بالاتر از ۴ درصد ائوزینوفیل خون به عنوان افزایش ائوزینوفیل (ائوزینوفیلی) در نظر گرفته شد.

آزمایش سرولوژی (ایمونوفلورسانس غیرمستقیم): آنتی‌ژن مورد استفاده در این روش لاروهای خارج شده از تخم بود که با استفاده از سفیده تخم مرغ رقیق شده با بافر فسفات (۱:۵) به سطح لام می‌چسبید. برای بدست آوردن مقادیر زیاد تخم انگل به عنوان پادگن به منظور انجام آزمایش سرم‌شناسی؛ شربت پپرازین سترات و راهنمائی لازم در زمینه‌چگونگی مصرف دارو جهت دفع کرم در اختیار آنان قرار می‌گرفت. ضمناب به هر نفر یک سطل پلاستیکی جهت جمع‌آوری مدفوع ۲۴-۴۸ ساعته داده می‌شد. سپس مجدداً برای گرفتن سطلهای حاوی آسکاریس‌های دفع شده به محل سکونت افراد مراجعه نموده و کرمها در ظروف شیشه‌ای دردار جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل می‌شد. سپس کرمهای ماده پس از شستشو با آب مقطر و سرم فیزیولوژی؛

طی مهارجرت از ارگانهای مختلف از قبیل روده؛ کبد؛ و ریه‌ها 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 خوکهایی 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 منجر به تولید ادم و آمفیزم گردیده و نیز تهاجم سریع سلولهای التهابی از قبیل ائوزینوفیل بلافاصله پس از ورود لارو به ریه؛ قابل ردیابی نمی‌باشد (۶). مطالعات متعدد، تولید پادتن را در آلودگی با گونه‌های Ascaris چونندگان نشان داده است. پادتن‌های تولید شده در این حیوانات شامل کلاسه‌ها و زیر کلاسه‌های ایمونوگلوبولین‌ها می‌باشد (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 میشد موجب تحریک تولید 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 بالای A.lumbricoides در بسیاری از روستاهای کشور؛ انجام تحقیق در زمینه جنبه‌های 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.

آزمایش از الکتروفورز سرمها بر روی استات سلولز استفاده شد. در این روش با استفاده از بافر باریتورات و ولتاژ ۱۸۰ و زمان ۱۵ دقیقه الکتروفورز انجام شده و سپس توسط Cilin scan - 2 اسکن می گردید. مطالعه مقطعی بوده و از t - test برای آنالیز آماری نتایج استفاده شد.

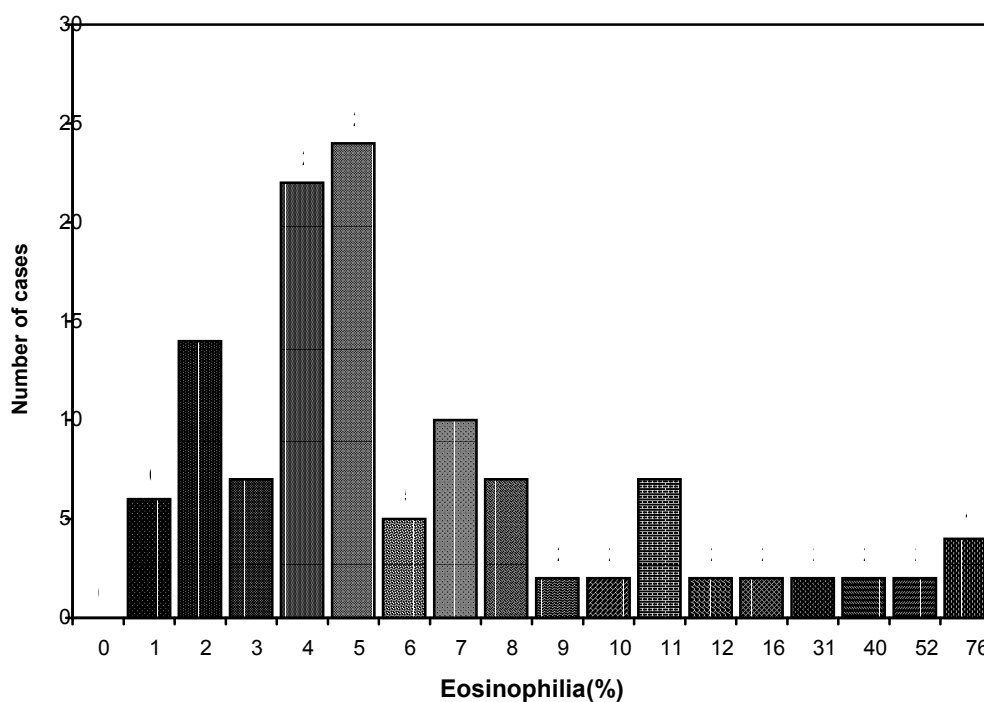
نتایج

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

تشریح و رحم آنها جدا گردیده و در یک پلیت حاوی آب معمولی له می شد تا تخمها از رحم جدا شوند. پس از گذشت حدود دوهفته که لارو در درون تخم تشکیل می شد؛ آب حاوی تخم لاروه شده در یک فلاسک شیشه ای ریخته شده و با اضافه کردن گلوله های شیشه ای به آرامی تکان داده می شد تا لارو از درون تخم آزاد شود و در آزمایش سرم شناسی مورد استفاده قرار گیرد. در این مطالعه از ۱۷ نمونه سرم نوزاد که به عنوان کنترل منفی آزمایش شده بودند ۲ نمونه با رقت ۱:۱۰ مثبت شده بود در حالیکه با رقت ۱:۲۰ سرم هیچیک از نوزادان مثبت نشد. به همین دلیل رقت ۱:۲۰ به عنوان عیار مرزی (Borderline) انتخاب گردید.

الکتروفورز سرم:

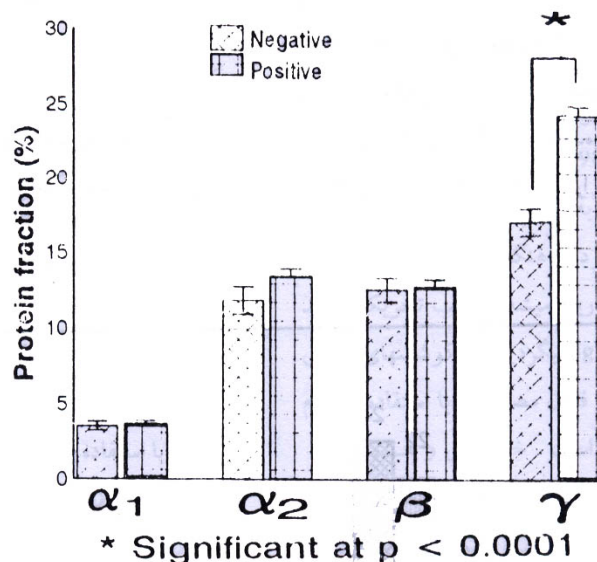
برای مطالعه میزان گلوبولین های سرمهای مورد



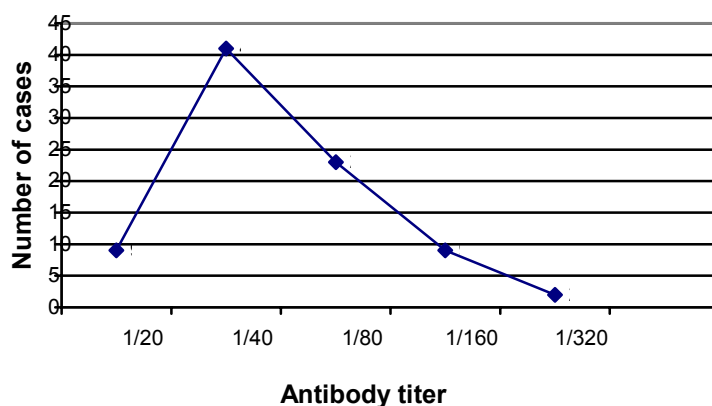
نمودار شماره ۱: درصد ائوزینوفیل در ۱۲۰ فرد آلوده به A.lumbricoides در روستای خیرآباد اصفهان

رم افراد آلوده به آسکاریس از نظر وجود پادتن به روش ایمنولوژی فلورسانس آنتی بادی غیر مستقیم مورد مطالعه قرار گرفت که نتایج حاصله در منحنی شماره ۱ آمده است. همانگونه که در این منحنی ملاحظه میگردد بیشترین تعداد افراد آلوده دارای تیتراژ ۱:۴۰ بوده و تنها دو نفر دارای تیتراژ ۱:۳۲۰ بودند. جمعاً ۳۵ نفر فاقد عیار پادتن بودند.

نتیجه الکتروفورز سرم خون افراد آلوده برای تعیین اجزاء پروتئینی آلفا-۱، آلفا-۲، بتا و گاما در نمودار شماره ۲ ارائه شده است. سرم افرادی که با روش ایمنولوژی فلورسانس دارای عیار پادتن بودند افزایش قابل ملاحظه گلوبولین گاما را نسبت به سرمهای فاقد عیار پادتن نشان دادند ($P < 0.0001$) میزان آلفا-۱، آلفا-۲ و بتا در هر دو گروه مثبت و منفی متغیر بوده و اختلاف معنی داری نداشت.



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.

بحث

در این تحقیق ۷۱ نفر (۵۹٪) ائوزینوفیل بالاتر از ۴ درصد را نشان دادند. افزایش میزان ائوزینوفیل در آسکاریس معمولاً موقتی بوده و بالاترین میزان آن سه هفته پس از آلودگی و در طی مهاجرت لارو ظاهر میگردد (۱۰)؛ ولی در بیمارانی که دارای کرم بالغ آسکاریس میباشند؛ ائوزینوفیلی جزئی بوده و یا اصلاً وجود ندارد (۱۰). ائوزینوفیلی و لوکوسیتوز یافته‌های آزمایشگاهی عفونت با *Toxocara canis* در انسان و حیوان و بخصوص در مرحله مهاجرت لارو آن هستند (۱۰). با توجه به نمودار شماره ۱ افزایش ائوزینوفیل میتواند نشانگر عکس العمل‌های آلرژیک در نتیجه مهاجرت لارو انگل در افراد مبتلا به *A. lumbricoides* و سایر انگلهای باشد. 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 آمده توسط محققین مختلف در رابطه با لاروهای مهاجر احشایی در انسان و حیوان (۱۰) به نظر میرسد یکی دیگر از علل بالا بودن میزان درصد ائوزینوفیل در چند فرد مورد مطالعه مهاجرت لارو کرمهایی چون *T. canis* در انسان باشد که متأسفانه به علت عدم وجود مدارک کافی در این زمینه در کشور ما اطلاع کافی در این مورد در دست نیست. به غیر از ۴ مورد ائوزینوفیلی بالا در بقیه موارد میانگین ائوزینوفیلی ۵/۵ درصد بوده است که احتمالاً نشان دهنده آلودگی افراد مورد مطالعه به کرم بالغ و نه مرحله لاروی آن است.

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

با الکتروفورز پروتئین سرم افراد آلوده نشان داده شد که در افرادی که با روش ایمونوفلورسانس دارای تیترا بالایی از آنتی‌بادی هستند پروتئین‌های منطقه گاما افزایش می‌یابد. هیپرگاما گلوبولینی در اثر عفونت با لاروهای مهاجر احشایی توسط محققین مختلف گزارش شده است (۱۲ و ۱۳). در آزمایش انجام شده توسط جلایر (Jalayer 1969) در غنایمیزان گلوبولین در همه سرمهای مورد مطالعه (مثبت و منفی) بالا بوده است و تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین سرمهای مثبت و کنترل مشاهده نشده است که این ممکن است به علت تولید آنتی‌بادیهای قبلی در اثر عفونتهای دیگر که بطور آندمیک در منطقه وجود دارند، باشد (۱۴). در این مطالعه الکتروفورز سرم‌های دارای عیار پادتن (مثبت) افزایش قابل ملاحظه گلوبولین گاما را نسبت به سرمهای فاقد عیار پادتن (منفی) نشان داد که با آزمون آماری اختلاف معنی داری در این دو گروه مشاهده گردید ($P < 0.0001$) ولی میزان گلوبولین‌های آلفا ۱، آلفا ۲ و بتا در هر دو گروه منفی و مثبت متغیر بود. میزان بالای گلوبولین گاما می‌تواند در ارتباط با افزایش پادتن و شاید تا حدودی نیز نشانگر کارایی روش ایمونوفلورسانس در تشخیص این آلودگی باشد.

نتایج بدست آمده نشان داد که از ۱۲۰ نمونه سرم؛ ۸۵ نمونه (۷۰٪) نتایج مثبت داشته و ۳۵ نمونه (۳۰٪) نیز منفی بوده 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 یا عفونتهای مکرر در آنها صورت گرفته است؟ به عبارت دیگر آیا عفونت‌های بعدی موجب بالا رفتن عیار بوده است یا خیر؟ آیا علاوه بر وجود کرم بالغ؛ مرحله لاروی انگل نیز در آنها موجود بوده است یا خیر؟ و بالاخره چه مدتی از زمان آلودگی

آلوده در حد قابل تشخیص نباشد زیرا سوابق افراد آلوده در این بررسی در دسترس نبوده است.

تقدیر و تشکر

بطور کلی گذشته از جنبه تحقیقی این بررسی نتایج به دست آمده نشان داد که با روش ایمونوفلورسانس و استفاده از لارو مرحله دوم، *A. lumbricoides* بعنوان پادگن؛ سرم ۳۰ درصد افراد آلوده نتایج منفی داده است. بنابراین روش مذکور را نباید اساس تشخیص آلودگی قرار داد بلکه میتواند فقط در بررسیهای سرواپیدمیولوژیک برای تشخیص حدود ۷۰ درصد موارد آلوده مورد استفاده قرار گیرد

فهرست منابع

1. Arffa , F. ; Ghadiran , E . Epidemiology and masstreatment of ascariasis in six rural communities in Central 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*

در فرد گذشته است ؟ نتایج بدست آمده از مطالعات انجام شده توسط لج کینا ، (Lejkina , 1974) بیانگر آن است که ۵-۱۰ روز پس از آلودگی با لارو آسکاریس پادتن در خون تولید شده و ۹۰-۱۰۰ روز باقی میماند(۱۵).

با توجه به سایر تحقیقات ؛ می توان چنین بیان نمود که علت منفی شدن سرمهای مورد مطالعه در این بررسی ؛ عدم وجود مرحله لاروی کرم در این عده ؛ آلودگیهای قبلی وجلوگیری از مهاجرت مجددلاروها در آلودگیهای بعدی و در نتیجه جلوگیری از تحریک سیستم ایمنی و تولید پادتن وبالاخره وجود تعداد کم کرم بالغ در آنها میباشد . شاید این موضوع یکی از دلایلی بوده است که میزان پادتن در سرم خون افراد

- suum in inbred guinea pigs : Passive transfer of immunity by cell or serum. Immunology 1987; 2: 205
10. Brown , H.W. , and Neva , F. , Basic clinical parasitology, 5th Edition. Appleton & Lange, Singapore. 1993:132-136
 11. Jones , H.I. Haemagglutination tests in the study of *Ascaris* epidemiology . Ann. Trop. Parasitol. 1977; 71(2):219-226
 12. Huntley, C.C. , Moreland, A. Gel diffusion studies with *Toxocara* and *Ascaris* extract. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1992; 12:204
 13. Soulsby , E.J. Immunization against *Ascaris lumbricoides* in the guinea pigs. Nature 1992; 179: 383
 14. Jalayer , T. Studies on *Toxocara canis* and visceral larva migrans. Ph.d. Thesis. 1969
 15. Lejkina, E.S. ; Guseinov, G.A. Results of application of serological reactions in determination of the stage of ascariasis. Med. Paraziter. Bolezni. 1974; 23:79