

دراسة للاستجابة المناعية الخلطية للأطفال المصابين بالشمانيا الاحشائية

هناء كامل حمد*

استلام البحث 3، حزيران، 2009
قبول النشر 28، كانون الاول، 2009

الخلاصة :

تم جمع عينات الدم من 40 طفلاً مصاباً بالكالازار تراوحت أعمارهم أقل من عشرة أعوام من مستشفى الطفل المركزي في الاسكان ومختبر الصحة المركزي في بغداد ، تم جمع 15 عينة دم اخرى لأطفال أصحاء من الفئة العمرية نفسها للمصابين بوصفها مجموعة سيطرة وذلك لغرض المقارنة إذ تم تحديد مستوى الامينوكلوبولينات المناعية (IgG, IgM, IgA) وذلك باستخدام اختبار التآلق للأضداد غير المباشر IFAT أظهر اختبار IFAT الذي استخدم في تشخيص الإصابة ارتفاعاً في مستوى الأضداد الذي تناسب طردياً مع شدة الإصابة و تراوحت عيارية الأضداد بين 1/16، 1/32، 1/64، إذ كان اوطأ مستوى لعيارية الأضداد هو 1/16 فيما سجلت عيارية 1/64 أعلى مستوى للأضداد في المجموعة .

سجلت معدلات تركيز الكلوبولينات المناعية IgG ، IgM ارتفاعاً td اثناء الإصابة بشكل ملحوظ فكانت (2012.9 mgd/l) و (154.2 mg/dl) على التوالي مقارنة بمجموعة السيطرة (874.3mg /dl) و (91.94mg/dl) فيما لم تظهر فروق معنوية في معدل تركيز IgA في مجموعة المصابين (143.8 mg/dl) عنه في مجموعة السيطرة (116.2mg /dl) .

الكلمات المفتاحية: الشمانيا الاحشائية ، الكلوبولينات المناعية ، المناعة الخلطية .

المقدمة :

يعد داء الشمانيا الاحشائية Visceral leishmaniasis أو ما يعرف بالكالازار kala azar او الحمى السوداء أحد الامراض الطفيلية الشائعة في انحاء متفرقة من العالم [1] . يوجد طفيلي الشمانيا في المضيف النهائي (الانسان) بشكل لاسوطي amastigote في خلايا الجهاز البطني الشبكي للاحشاء لاسيما الطحال والكبد ونخاع العظم والعقد للمفاوية المساريقية وعندما تأخذ ذبابة الرمل من جنس phlebotomus الاطوار عديمة السوط مع وجبة الدم اثناء التغذية ، تقطن الطفيليات المعوي الوسطي للحشرة وتتكاثر هناك وتتحول الى الطور امامي السوط promastigote وبذلك تسد المعوي وتهاجر الى المرئ والبلعوم والتجويف الفمي وعند ذلك تحقن الاطوار امامية السوط في مضيف جديد [2] . يعد العراق من البلدان المتوطنة بالكالازار لذا اهتم الباحثون بدراسة بعض الجوانب الوبائية والتشخيصية [3] . ومن اهم الجوانب التي حظيت بالدراسة الجانب المناعي نظراً لما يحدثه الطفيلي من تثبيط واضح في الجهاز المناعي للمضيف المصاب وقد تضمنت تشخيص الإصابة بالكالازار باستخدام اختبار التآلق المناعي غير المباشر Indirect Flouorescen Antibody Test (IFAT) وكذلك قياس مستوى الكلوبولينات المناعية الاساسي (IgG)

يعد داء الشمانيا الاحشائية Visceral leishmaniasis أو ما يعرف بالكالازار kala azar او الحمى السوداء أحد الامراض الطفيلية الشائعة في انحاء متفرقة من العالم [1] . يوجد طفيلي الشمانيا في المضيف النهائي (الانسان) بشكل لاسوطي amastigote في خلايا الجهاز البطني الشبكي للاحشاء لاسيما الطحال والكبد ونخاع العظم والعقد للمفاوية المساريقية وعندما تأخذ ذبابة الرمل من جنس phlebotomus الاطوار عديمة السوط مع وجبة الدم اثناء التغذية ، تقطن الطفيليات المعوي الوسطي للحشرة وتتكاثر هناك وتتحول الى الطور امامي السوط promastigote وبذلك تسد المعوي وتهاجر الى المرئ والبلعوم والتجويف الفمي وعند ذلك تحقن الاطوار امامية السوط في مضيف جديد [2] . يعد العراق من البلدان المتوطنة بالكالازار لذا اهتم الباحثون بدراسة بعض الجوانب الوبائية والتشخيصية [3] . ومن اهم الجوانب التي حظيت بالدراسة الجانب المناعي نظراً لما يحدثه الطفيلي من تثبيط واضح في الجهاز المناعي للمضيف المصاب وقد تضمنت تشخيص الإصابة بالكالازار باستخدام اختبار التآلق المناعي غير المباشر Indirect Flouorescen Antibody Test (IFAT) وكذلك قياس مستوى الكلوبولينات المناعية الاساسي (IgG)

*قسم علوم الحياة / كلية العلوم للبنات / جامعة بغداد

المواد طرائق العمل :

1- جمع العينات

تم جمع عينات الدم من الاطفال المصابين بالكالازار و المراجعين لكل من مختبر الصحة المركزي ومستشفى الطفل المركزي في الاسكان في محافظة بغداد

وذلك للمدة من كانون الثاني ولغاية حزيران 2008 ، وتم الحصول على مجموعتين من العينات:

المجموعة الاولى : المرضى Patient

شملت الدراسة 40 طفلاً من المشخصين باصابتهم بالكالازار تتراوح اعمارهم من ستة أشهر الى عشر سنوات ومن كلا الجنسين وتم التأكد من اصابتهم بالمرض من خلال الفحص المختبري IFAT الذي اجري لكل مريض في مختبر الصحة المركزي التابع لوزارة الصحة .

ذلك التخفيف من المصل الذي أعطى نتيجة موجبة بوصفه معياراً لشدة الإصابة .

ب - قياس تركيز الكلوبولينات المناعية **IgG ، IgA ، IgM**

تم قياس تركيز الكلوبولينات المناعية من نوع **IgG ، IgM ، IgA** باستخدام تقنية الانتشار المناعي الشعاعي المفرد **Single Radial Immunodiffusion Assay** بأطباق طريقة **Mancini [6]** وتم إجراء الفحص في وحدة المناعة في مستشفى البرموك التعليمي واستخدمت الأطباق المجهزة من شركة **Biomaghreb** وبموجب تعليماتها ، وتحوي هذه الأطباق على المكونات الآتية :

(**Buffered Saline Agarose, Sodium Azide, Monospecific Antiserum**)

وتم إجراء الاختبار كما يأتي:

1 . وضع حجم 5 مايكروليتر من المصل في إحدى حفر الأطباق المجهزة من شركة **Biomaghreb** باستخدام الماصة الدقيقة ، وتركت الأطباق مكشوفة دون تحريك مدة 5 دقائق منعاً لتجمع البخار من جهة ولضمان تجانس انتشار المصل من جهة أخرى .

2 . غُلقت الأطباق بأحكام ووضعت في الثلاجة بدرجة 4م وبشكل أفقي مدة 48 ساعة لكل من **IgG ، IgA** . أما طبق **IgM** فترك مدة 72 ساعة في الثلاجة .

3 . بعد انتهاء مدة التفاعل المقررة ، تم قياس قطر حلقة الترسيب المتكونة حول كل حفرة نتيجة التفاعل بين الأضداد والمستضدات وذلك باستخدام منظار خاص لقياس التحليل المناعية **Immunoviewer** ، ومن معرفة قطر حلقة الترسيب يمكن استخراج قيمة التركيز وذلك بالاستعانة بالجدول المرافق مع الأطباق المجهزة من الشركة المصنعة . وتكون قراءة التركيز بوحدة (mg/dl)

النتائج والمناقشة:

أظهرت نتائج هذه الدراسة عدم وجود فروق معنوية بين الذكور والإناث من حيث عدد الإصابات أو الأعراض السريرية أو التغيرات المصلية ، وأظهرت النتائج أن أعلى نسبة للإصابة تركزت بين الأطفال ممن أعمارهم سنتان فما دون والذين يسكنون المناطق الزراعية في محافظات واسط ، بغداد ، الأنبار والنجف. وتمثلت الأعراض السريرية للمصابين بحمى متقطعة و نحول عام و

ب- المجموعة الثانية : مجموعة السيطرة **Control Group (الإصحاء)** .

جمعت 15 عينة دم لاطفال من الفئة العمرية نفسها لمجموعة الاطفال وقد تم التأكد من سلامتهم من خلال إجراء فحص الدم لكل فرد في المجموعة .

2- معاملة عينات الدم

اتبعت طريقة **Garvey et al (4)** وذلك بسحب 5 مل من الدم الوريدي من كل طفل من كلتا المجموعتين باستخدام محقنة معقمة ووضعه في انبوبة اختبار مرقمة و معقمة لاتحتوي على مانع لتخثر الدم وترك بدرجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة ثم بعدها نبذها مركزياً بجهاز الطرد المركزي بسرعة 2000 دورة/دقيقة ولمدة 15 دقيقة، سحبت الطبقة العليا (المصل) ووضعت في انبوبة بلاستيكية معقمة بدرجة حرارة -20م الحين الاستعمال .

3- الاختبارات المصلية **Serological Test**

أ- اختبار التآلق المناعي غير المباشر **IFAT** تم إجراؤه في مختبر الصحة المركزي واتبعت طريقة **Goldman (5)** كما يأتي :

1 . تم تخفيف مصل الشخص المشكوك بإصابته باستخدام محلول داريئ الفوسفات .

2 . وُضعت قطرة من المصل المخفف على شريحة المستضدات المحضرة سلفاً والمحافظة في الثلاجة .

3 . حُضنت الشريحة مدة 30 دقيقة في حمام مائي بدرجة 37 م .

4 . أُجريت عملية غسل الشريحة لثلاث مرات متتالية : اثنتان منها بمحلول داريئ الفوسفات والثالثة بالماء المقطر لإزالة أملاح الداريئ.

5 . تمت إضافة المقترن **Conjugate** وهو عبارة عن **Anti-Antibody** للكلوبولينات المناعية **IgG ، IgM** أو خليط منهما مقترنة مع صبغة **Isothiocyanate** .

6 . حُضنت الشريحة في 37م مدة 30 دقيقة .

7 . بعد انتهاء مدة التفاعل أُجريت عملية غسل كما في الخطوة 4 ثم جُففت الشريحة .

8 . أُضيفت قطرة من داريئ الكليسرول للشريحة وفُحصت تحت المجهر المتألق للتحري عن وجود أو عدم وجود الأضداد، إذ يعطي الطفيلي في حال وجود الأضداد متألقاً باللون الأخضر المصفر تتناسب شدته مع شدة الإصابة، في حين لا يظهر هذا الإشعاع عند كون الفحص سالباً. ويعتمد

625.3) وظهرت فروق معنوية ($P < 0.05$) بين مجموعة المصابين ومجموعة السيطرة (جدول 2).

جدول (2): معدل تركيز الكلوبولين المناعي G (IgG) في مصول مجموعة الأطفال المصابين بالكلازار ومجموعة السيطرة والمشخصين باختبار IFAT

عيارية فحص التآلق المناعي غير المباشر (IFAT)			Mean±SE لتركيز (mg/dl) IgG	مجاميع الدراسة
1/64	1/32	1/16		
1563.7969 ± 409.7127	2092.6315 ± 548.1469	2382.5653 ± 625.30505	2012.9 ± 527.73	مجموعة المصابين No=40
			874.3 ± 168.87	مجموعة السيطرة No=15

3- الكلوبولين المناعي M (IgM)

أظهرت نتائج الدراسة حدوث ارتفاع واضح في معدل تركيز الكلوبولين المناعي M في مجموعة المصابين (154.2 ± 27.6) مقارنة بالمعدل في مجموعة السيطرة (23.1 ± 91.9) ، وسجل المعدل أقل ارتفاع له عند عيارية 1/16 (31.6 ± 175.6) فيما تقاربت معدلات تركيز IgM عند عياريتي 1/32 و 1/64 فكانت (30.1 ± 167.1) و (21.1 ± 119.9) على التوالي . وجدت فروق معنوية بمقدار ($P < 0.05$) بين مجموعة المصابين ومجموعة السيطرة (جدول 3) .

جدول (3): معدل تركيز الكلوبولين المناعي M (IgM) في مصول مجموعة الأطفال المصابين بالكلازار ومجموعة السيطرة والمشخصين باختبار IFAT .

عيارية فحص التآلق المناعي غير المباشر (IFAT)			Mean ± SE لتركيز (mg/dl) IgM	مجاميع الدراسة
1/64	1/32	1/16		
119.9129 ± 21.1612	167.1259 ± 30.1820	175.6156 ± 31.6290	154.2 ± 27.66	مجموعة المصابين No=40
			91.9 ± 23.19	مجموعة السيطرة No=15

4 - الكلوبولين المناعي A (IgA) :

لوحظ حدوث ارتفاعاً طفيفاً في معدل تركيز الكلوبولين المناعي A في مجموعة المصابين (85.4 ± 143.8) مقارنة بالمعدل في مجموعة السيطرة (37.1 ± 116.2) . فيما كان الانخفاض في المعدل أكثر وضوحاً عند عيارية (63.7 ± 138.5) 1/16 ، إلا أن نتائج التحليل الإحصائي أظهرت عدم وجود فروق معنوية بين مجموعة المصابين ومجموعة السيطرة (جدول 4) .

فقدان الشهية وإسهال وسعال ، أما تضخم الكبد والطحال فسجل تبايناً بحسب شدة الإصابة إذ كانت حالات التضخم أقل في المراحل المبكرة منه فيما كانت نسبة التضخم أكبر مع تقدم الإصابة.

جاءت نتائج اختبار التآلق المناعي IFAT الذي اعتمد في تشخيص الإصابة وشدتها بعياريات مختلفة تبعاً لشدة الإصابة، وتراوحت العياريات لمجموعة المصابين قيد الدراسة بين 1/16 ، 1/32 ، 1/64 . وأظهرت نتائج التحليل الإحصائي أن أعلى نسبة للمصابين والبالغة 42.5% كانت عند عيارية 1/16 ، فيما وصلت نسبة المصابين عند عيارية 1/32 إلى 35% ، أما أقل نسبة للمصابين فكانت عند عيارية 1/64 وبلغت 22.5% (جدول 1) ..

جدول (1): النسبة المئوية % وعدد الإصابات لعيارية اختبار التآلق للأضداد الغير مباشر (IFAT) في مجموعة المصابين

مجموعة المصابين	عدد الإصابات	النسبة المئوية %
عيارية 1/16	17	42.5
عيارية 1/32	14	35.0
عيارية 1/64	9	22.5
المجموع	40	100.00

تبين النتائج وجود مراحل مختلفة من الإصابة ازدادت العيارية نتيجة ارتفاع مستوى الأضداد [7، 8] ولذلك فإن عيارية 1/16 تمثل مرحلة مبكرة من الإصابة مقارنة بعيارية 1/64 التي تمثل المرحلة المتقدمة منه في المجموعة والتي سجلت أعلى مستوى للأضداد ، ويعود سبب هذا الارتفاع المستمر في مستوى الأضداد إلى ازدياد أعداد الطفيلي ما يؤدي إلى تحفيز اللغافويات البائية على توليد خلايا بلازمية Plasma cells بصورة مستمرة والتي تقوم بدورها بإنتاج الأضداد [9] . هذا وتمت مقارنة نتائج فحوص كل عيارية مع مجموعة السيطرة (الأصحاء) بهدف التعرف على التغيرات الحاصلة في أثناء المراحل المختلفة من الإصابة .

2 - الكلوبولين المناعي G (IgG) :

أظهرت نتائج قياس تركيز الكلوبولين المناعي G وجود ارتفاع معنوي في التركيزين مجموعة المصابين ومجموعة السيطرة (527.7 ± 2012.9) ، (874.3 ± 168.8) على التوالي وكان أعلى ارتفاع للمعدل عند عيارية (409.7 ± 1563.7) 1/64 فيما انخفض المعدل عند عيارية 1/32 (2382.5 ± 548.1) 1/16

4. Garvey, J. S., Cremer, N. E. and Sussdorf, D. H. 1981. Methods in Immunology. 3rd ed. W. B. Saunders, Philadelphia, pp. 297.
5. Goldman, M. 1957 Staining *Toxoplasma gondii* with fluorescent labelled antibody. J. Exp. Med. 105 (1): 54 – 556
6. Mancini, H.S., Carbonara, A. O., Heremans, J. F., 1965. Immunochemistry pp.235..
7. Choudhar, A., Puri, P., Guru, Y. and Saxena, K. 1992. An indirect fluorescent antibody (IFAT) test for the serodiagnosis of kala-azar. J. Commun. Dis. 24 (12):32-36.
8. Jamshaid, I., Hira, P., Saroj, G., Philip, R., Al-Ali, F., Madda, P. and Sher, A. 2002. Imported Visceral Leishmaniasis: Diagnostic Dilemmas and Comparative Analysis of Three Assays. J. Clin. Microb., 3(25): 475-479.
9. Singh, S. 2006 New development in diagnosis of leishmaniasis. Indian J. Med. 132(3): 311-330.
10. Rajesh, R., Bibhuti, S. and Nahid, A. 2004. Characterization of Immunoglobulin G and Its subclass Response to Indian kala – azar Infection before and after chemotherapy. Infect. Immun. 72(7): 863-870.
11. Anam, K., Afrin, F., Banerjee, D., Pramanik, N., Guha, S., Goswami, R., and Ali, N. 1999. Differential Decline in Leishmania Membrane Antigen-Specific Immunoglobulin G (IgG), IgM, IgE, and IgG Subclass Antibodies in Indian Kala-Azar Patients after Chemotherapy. Infect. Immun. 67(2): 6663-6669.
12. Ravanbod, M. 2000. Kala-azar in Adults: A case Presentation and Review. SEMJ. 2(6):20-34.
13. Al-Orainey, I., Gasim, I., Singh, L., Ibrahim, B., Sylvester, O. and Shekhawat, B. 1994. Visceral

جدول (4) : معدل تركيز الكلوبولين المناعي (IgA) A في مصول مجموعة الأطفال المصابين بالكلازار ومجموعة السيطرة والمشخصين باختبار IFAT .

عيارية فحص التلق المناعي غير المباشر (IFAT)			Mean ± SE لتركيز (mg/dl) IgA	مجاميع الدراسة
1/64	1/32	1/16		
148.33 ± 124.95	144.50 ± 67.51	138.55 ± 63.75	143.8 ± 85.41	مجموعة المصابين No=40
			116.2 ± 37.1	مجموعة السيطرة No=15

من نتائج قياس مستويات الكلوبولينات المناعية ، نلاحظ حدوث ارتفاع كبير في مستويات الكلوبولين المناعي G والكلوبولين المناعي M أثناء الإصابة ، وأن هذا الارتفاع يزداد مع تقدم الإصابة حيث نلاحظ أن أعلى مستوى للـ IgG و IgM كان عند عيارية 1/64 والتي تمثل أعلى مراحل الإصابة في المجموعة .

وتتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه كل من [10، 11، 12] حيث أكدوا على أن الإصابة بالكلازار يؤدي إلى ارتفاع مستويات الكلوبولينات المناعية عموماً و IgG بصورة خاصة مقارنة مع مجموعة السيطرة ، وهذا التحفيز يعتمد على عدد الطفيليات في الطحال ، إذ يزداد عدد الخلايا الفارزة للكلوبولين في الطحال بزيادة أعداد الطفيلي نتيجة زيادة تحفيز الخلايا البائية مما يؤدي إلى زيادة إنتاج الكلوبولينات المناعية وبنائها وبالتالي ارتفاع مستوياتها في أثناء الإصابة (12). أما الكلوبولين المناعي A فقد أظهرت نتائج الدراسة عدم وجود فروق معنوية في مستواه في مجموعة المصابين عنه في مجموعة السيطرة ، وهذا يتوافق مع ما توصل إليه [13، 14] .

المصادر:

1. Salam, M.A. 2004 . Leishmaniasis : Biological understanding and beyond. Pak. J. Med. Sci. 20(6):164-16
2. Braunwald, E., Fauci, A. and Hauser, S. 2001. Leishmaniasis. In: Harrison's Manual of Medicine 15th ed. McGraw-Hill, pp.311.
3. Rasheed, Z. N. 2004 . Leishmaniasis in Iraq. Leishmania and zoonotic disease section, Communicable Disease Control Center CDC /Baghdad/ Iraq.

of *leishmania donovani* Antigen specific Immunoglobulin G3 in indian kala-azar patients .Clin. and Diag. Lab. Immun. 2(6) : 231-253.

Leishmaniasis in Gizan, Saudi Arabia. SMJ. , 5 (14): 75-80.
14. Airal, A., Farhat,A. and Dwijadas, B. 1999 .Immunoglobulin subclass Distribution and Diagnostic value

Study of Humoral Immune Response In Children Infected With Visceral Leishmaniasis

*Hanaa Kamil Hamd **

*Baghdad University, College of Science for Women, Department of Biology

Abstract:

40 blood sample were taken from children infected with kala-azar at age less than ten years, who were admitted to El-Eskan child hospital, and central health laboratory in Baghdad. At the same time 15 sample collected from healthy child for comparing. During research estimated immunoglobulins level (IgG, IgM, IgA) and (IFAT)

IFAT test recorded a higher indicate antibodies level witch was synergistic with infected severity, the stander level of antibodies arrange between 1/16, 1/32 and 1/64 that means it graduate from the lowest one 1/16 into the highest one 1/64 within groups.

During infectious the IgG ,IgM level recorded the higher level (2012.9 mg/dl) and (154.3 mg/dl) compared to the control group (874.3 mg/dl), (91.4 mg/dl) while there no significant differences in IgA level between patients group(143.8 mg/dl) And healthy control group (116.2 mg/dl) .