مجلة جامعة تكريت للعلوم الزراعية المجلد(12) العدد(3)–(2012)
ISSN-1813-1646

محاولة لتنمية الاميبا الحالة للنسيج وتحقيق فرضية كوخ للإصابة بها في الأرانب النيوزلندية

عبد الوهاب بديوي حسين[1] وإسراء عدنان شاكر[2]
[1]كلية الطب البيطري–جامعة الأنبار.
[2]وزارة التربية

الخلاصة :

درست إمكانية زرع الاميبا الحالة للنسيج لأطول فترة ممكنة مع تمنيع الأرانب بالمصل وخلايا الطحال للأرانب الممنعة لحمايتها من الإصابة بخراج الكبد الأميبي وكذلك معرفة مدى تأثير المصل الممنع على حيوية ونشاط الاميبا الحالة للنسيج *Entamoeba histolytica* أظهرت النتائج إمكانية زرع وحفظ الطفيلي لفترة (35) يوم وبدرجة حرارة 4 مْ حيوية بلغت أكثر من 50% وبينت النتائج إذا حقن المصل الممنع وفر نسبة حماية 60% من الإصابة بخراج الكبد الأميبي وعند حقن خلايا الطحال بلغت نسبة الحماية 66.71%، أما عند معاملة الطور الخضري مع المصل الممنع فقد بلغت نسبة حيوية الطفيلي 49.67% مقارنة مع السيطرة 72.33% بعد 12 ساعة من بدا التجربة وفي الساعة 204 بلغ معدل نسبة نشاط الطفيلي 0.33% مقارنة مع السيطرة 25.33%.

الكلمات الدالة :
الاميبيا ، فرضية كوخ ، الارانب

للمراسلة :
عبد الوهاب بديوي حسين
[1]كلية الطب البيطري–جامعة الأنبار

الاستلام:
2010–12–8
القبول :
2011–5–2

A tried for culturing *Entamoeba histolytica* in vitro and confirming its infectivity using Kock's postulate in Newzeland Rabbits

A.B. Hussain[1] and A. A. Shakr[2]
[1]College of Veterinary Medicine-University of Anbar
[2]Ministry of Education

KeyWords:
Entamoeba histolytica , Kock's postulate

Correspondence:
A.B. Hussain
College of Veterinary Medicine-University of Anbar

Abstract :

This study was conducted for culturing *Entamoeba histolytica* trophozoit for a long period and immunization of newzealand rabbit with a serum and spleen cell from in fetal one for protect them from amoebic abscess and the effect of immunized serum on trophozoit *in vitro*.The results revealed that the ability to culture the trophozoit of parasite for period (35) days with viability (50%) immunized animal with immunized serum and spleen cell against amoebic liver abscess gave protection 60% and 66.71% respectively. The viability percentages of trophzoit *in vitro* when treated with immunized serum 49.67% as compared with the control group 72.33% after 12 hours and in hour 204 the percentage of viability 0.33% as compare with control group 25.33%.

Received:
8-12-2010
Accepted:
3-4-2011

المقدمة

تعد الاميبا الحالة للنسيج *E. histolytica* من الطفيليات الواسعة الانتشار في جميع أنحاء العالم فقد حصل (Hussain، 2009) على نسبة إصابة كلية بلغت 16.9% في مدينة بغداد وفي المناطق حول مدينة بغداد حصل (Al- Hamdani، 1993) على نسبة إصابة بلغت 18.9% وحصل (Al- Kubaissi، 2003) عند فحص 1592 و826 عينة براز أطفال والبالغين المصابين بالإسهال على نسبة إصابة بالاميبا الحالة للنسيج (17.14%) و(22.51%) في كل من الأطفال والبالغين على التوالي. تنتقل الإصابة من الأمعاء عن طريق الدم إلى الكبد مسببة خراج الكبد الاميبي (Anderson، 2000) وذكر (Okada وآخرون، 2005) إن الاميبا تخترق الأمعاء ثم يتبعها تحطيم الأنسجة وحصول التهابات خلال عمليات الاختراق ويقتل الطفيلي الخلايا الطلائية والخلايا المناعية وكريات الدم الحمراء ويقوم ببلعمتها Phagocytosiss وتحفز الاميبا الحالة للنسيج كل من المناعة الخلطية والخلوية في الإنسان ولازالت الميكانيكية المناعية التي تحد من اختراق الطفيلي في الإنسان غير معروفة (Haque وآخرون، 1997؛ Dodson وآخرون، 1997). وأشار (Carrero وآخرون، 2007) إن الإصابة المعوية بالطفيلي تحفز الاستجابة المناعية مع زيادة تركيز الأجسام المضادة المفرزة نوع SIgA ولوحظ وجود هذه الأجسام المضادة في الخروج واللعاب وحليب الأمهات المصابات بالزحار الاميبي ووجد إن الأجسام المضادة المفرزة SIgA تثبط التصاق الاميبا بالخلايا الطلائية للأمعاء في الزجاج من خلال تمييزه للمستضدات الغشائية المختلفة وتتضمن Galactose-binding(Gal-lectin) والمستضد Cysteinrich protein ولاحظ وجود الأجسام المضادة SIgA في البراز بعد شفاء المصابين من خراج الكبد الأميبي ووجد إن المستضدات الأميبية تشجع الطبقة المخاطية للأمعاء لإفراز الأجسام المضادة نوع SIgA ووجد (Abd- Alla وآخرون، 2000؛ Ravdin وآخرون، 2003) إن الأجسام المضادة نوع IgA, IgG المضادة لبروتينAnti-Lc3 موجودة في مصل 90% من المصابين بالاميبا واستنتج (Abd-Alla وآخرون، 2004؛ Abd- Alla وRavdin، 2005) حصول استجابة مناعية لإفراز SIgA في الأمعاء ضد الطفيلي.

المواد وطرائق البحث

الحيوانات المستعملة في التجربة: استخدم (15) أرنبا نيوزلنديا ابيضا وبأوزان تراوحت بين (710–800) غم وبعمر تراوح بين (4–8) أسابيع إذ وضعت هذه الحيوانات في غرفة خاصة وفي أقفاص بلاستيكية معدة لهذا الغرض وتركت هذه الحيوانات في ظروف بيئية ملائمة من حيث درجة الحرارة والإضاءة وتم تزويدها بالعلف والماء يوميا.

جمع العينات: تم جمع عينات البراز من الأشخاص المصابين للاميبا الحالة للنسيج حيث أخذت مسحة من البراز وزرعت في الوسط الزرعي المكون من المواد الآتية: (1 مل من 3% اكار، 8 مل من محلول لوك رنكر، 1 مل من مصل الحصان المثبط في 56 مْ) وحسب طريقة (Alder وFoner، 1941) بعدها حفظت في 4مْ. تم قياس حيوية الطفيلي باستخدام صبغة التريبان الزرقاء لهذا الغرض وحسب طريقة (Alder وFoner، 1941). تم تحضير مستضدات الطفيلي وحسب طريقة (Denis وChadee، 1989). تم تحضير عالق الطفيلي حسب طريقة (Denis وChadee، 1989).

طريقة التمنيع: تم حقن الأرانب النيوزلندية البيضاء حسب طريقة (14) إذ قسمت الحيوانات إلى مجموعتين:

المجموعة الأولى: منعت ثلاثة حيوانات عن طريق العضلة في اليوم الأول بمستخلص الطور الخضري المطحون بما يعادل 10^3X1 طفيلي وبعد 14 يوم أعطيت جرعة تمنيع معززة للأولى 10^3X1 طفيلي بواسطة محقنة (1 مل) ثم أعطيت جرعة التحدي 2 X 10^4 طور الخضري عن طريق الكبد بعد 28 يوم من إعطاء جرعة التمنيع الأولى.

المجموعة الثانية: أعطيت 3 حيوانات جرعتين من محلول (PBS) بمقدار 0.1 مل في اليوم الأول واليوم (14) في العضلة ثم أعطيت جرعة التحدي 2 X 10^4 طور خضري عن طريق الكبد بعد 28 يوم من إعطاء الجرعة الأولى.

مصل الأرانب: تم تخدير الأرانب الممنعة بمستخلص الطور الخضري في العضلة بعد 21 يوم من إعطاء جرعة التحدي في الكبد وبعدها سحب الدم من القلب وذلك باستعمال محقنة طبية (1 مل) ووضع في أنابيب بلاستيكية معقمة ثم ترك ليتجلط وبعدها دور في جهاز الطرد المركزي بسرعة 2000 دورة/ دقيقة لمدة (15 دقيقة) استخدم جزء منه في تمنيع الأرانب مباشرة واحتفظ بجزء أخر في درجة حرارة (20–) مْ من اجل دراسة تأثير المصل الممنع على حيوية الاميبا الحالة للنسيج في الزجاج.

تم تحضير الخلايا اللمفاوية وحقنها وحسب طريقة (Hudson وHay، 1980).

وتم حقن المصل الممنع حسب طريقة (Al-Gumaily، 1990).

تم حقن الأرانب بالخلايا اللمفاوية وحسب طريقة (Al-Gumaily، 1990).

تأثير المصل الممنع على حيوية الاميبا الحالة للنسيج في الزجاج بعد جمع المصل من الأرانب الممنعة بمستخلص الطور الخضري للاميبا الحالة للنسيج في العضلة اخذ منه 1 مل وأضيف إلى 1مل من مزرعة الطفيلي وتم حساب حيوية الطور الخضري للطفيلي باستخدام صبغة التريبان الزرقاء كل 12 ساعة أما مجموعة السيطرة فأضيف لها مصل أرنب غير ممنع وبنفس التركيز.

دراسة عيوشة حيوية الاميبا الحالة للنسيج في الوسط الزرعي: تم حساب عيوشة حيوية الطور الخضري للاميبا الحالة للنسيج باستخدام صبغة التريبان الزرقاء كل 7 أيام إذ ان الطفيلي الذي يصبغ بهذه الصبغة يعد ميتا في حين الذي لا يصبغ يعد حيا واستمرت التجربة 77 يوم.

النتائج والمناقشة

يظهر جدول (1) النسبة المئوية لحيوية الطور الخضري خلال فترة (77) يوم وكانت مرتفعة خلال الأسابيع الأولى وأعطت أفضل حيوية في الأيام (7) (21) إذ بلغت (75.33، 65.33)% على التوالي ثم انخفضت بشكل تدريجي خلال الأيام (28، 35، 42) إذ وصلت إلى (53، 44.33، 32.67)% وبلغ أعلى انخفاض لها في اليوم (77) وبنسبة (0.67)%.

جدول (1) النسبة المئوية لحيوية الطور الخضري للاميبا الحالة للنسيج خلال فترة (77) يوم

الأيام	معدل النسبة المئوية لحيوية الطور الخضري للاميبا الحالة للنسيج خلال فترة (77) يوم	الانحراف المعياري
اليوم الأول	80	± 1
7	75.33	± 5.51
14	70	± 2
21	65.33	± 4.51
28	53	± 2.65
35	44.33	± 5.13
42	32.67	± 2.08
49	29	± 1
56	22	± 2.65
63	13.67	± 3.21
70	5.33	± 0.58
77	0.67	± 0.58

أظهرت التجربة ان حقن المصل الممنع في الوريد الاذني للأرانب النيوزلندية يؤدي إلى حماية الأرانب النيوزلندية البيضاء من الخمج بجرعة التحدي بصورة جزئية إذ وفر حماية بلغت (60%) عند إعطاء جرعة التحدي عن طريق الكبد مقارنة بمجموعة السيطرة وكما موضح في الجدول (2).

جدول (2) النسبة المئوية للحماية التي توفرها جرعة التمنيع بالمصل ضد الإصابة بخراج الكبد الاميبي

المجموعة	معدل عدد الخراجات	الانحراف المعياري	النسبة المئوية للحماية
الممنعة	3	± 1.73	%60
السيطرة	706	± 0.71	

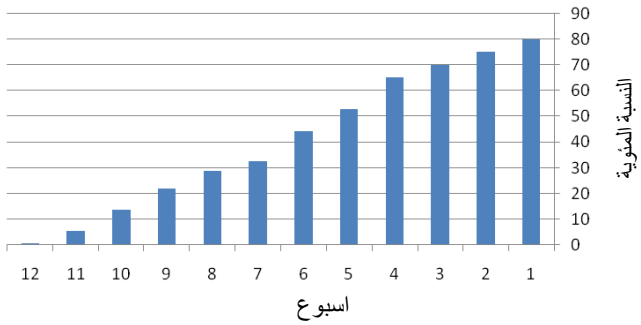
أظهرت التجربة إن حقن خلايا الطحال الممنعة في التجويف الخلبي للأرانب النيوزلندية البيضاء يؤدي إلى وقاية الأرانب من الخمج بجرعة التحدي ويظهر إن حقن خلايا الطحال الممنع وفر نسبة حماية (66.71 %) عند إعطاء جرعة التحدي عن طريق الكبد مقارنة بمجموعة السيطرة لنفس المجموعة وكما في الجدول (3).

جدول (3) النسبة المئوية للحماية التي توفرها جرعة التمنيع بخلايا الطحال ضد الإصابة بخراج الكبد الاميبي

المجموعة	معدل عدد الخراجات	الانحراف المعياري	النسبة المئوية للحماية
الممنعة	2.33	± 0.58	% 66.71
السيطرة	7	± 2.83	

- **تأثير المصل الممنع على حيوية الطور الخضري في الزجاج:**

أظهرت النتائج إن للمصل الممنع تأثير على حيوية ونشاط الاميبا الحالة للنسيج في الزجاج حيث بدأت التجربة بنشاط بلغ معدل نسبته 80% في كل من مجموعة السيطرة والتجربة في الوقت صفر وبدا التأثير منذ الساعات الأولى إذ بلغت في الوقت 12 ساعة 49.67% في مجموعة التجربة مقابل 72.33% في مجموعة السيطرة واستمر هذا التأثير ليبلغ 19.33% في مجموعة التجربة (المصل الممنع) مقابل 62% في مجموعة السيطرة وفي الساعة 120 بلغ التأثير في مجموعة التجربة 7% مقابل 47.67% في مجموعة السيطرة وبلغت ذروة تأثير إضافة المصل الممنع في مجموعة التجربة 0.33% مقابل 25.33% في مجموعة السيطرة في الوقت (204) ساعة لاحظ الجدول (4).



شكل(1) معدل النسبة المئوية لعيوشية الطور الخضري للاميبيا الحالة للنسيج خلال (77) يوم

جدول (4) يوضح تأثير إضافة المصل الممنع إلى الوسط الزرعي على حيوية الطور الخضري في الزجاج

الوقت بالساعة	مجموعة السيطرة	المجموعة الممنعة
0	8.0 ±5	8.0 ±2
12	49.67±0.58	72.33±2.52
24	31.3 ±4.92	66.0 ±4
36	22.33 ±1.53	65.0 ±5
48	19.33 ±1.15	62.0 ±2.65
60	16.67 ±1.53	61.33 ±3.1
72	14 ±2.65	56.67 ±5.77
84	11.33 ±1.53	54.0 ±5.29
96	10.33±1.53	54.0 ±6.93
108	8.67 ±2.08	48.33±1.53
120	7.0 ±2	47.67 ±2.52
132	6.67 ±0.58	42.33 ±2.52
144	5.67 ±1.53	41.0±1
156	5.0 ±1.73	38.67 ±1.15
168	3.33 ±1.53	35.0 ±5
180	3.0 ±1	31.67 ±2.89
192	3.0 ±1	30.67 ±1.15
204	0.33 ±0.58	25.33±5.03

أظهرت نتائج زرع الطفيلي في الزجاج ان النسبة المئوية لحيوية الطور الخضري في ذلك الوسط بلغت 80% في اليوم الأول بعد فترة الحضانة و53 % في اليوم 28 واستمر نزول نسبة حيوية الطور الخضري حتى وصل 0.67% في اليوم 77 فقد استطاع العديد من الباحثين من زرع الطفيلي خارج القطر في الزجاج *In vitro* و لفترات مختلفة (Boettner وآخرون، 2005؛ Asgharpour، 2005) إلا إن هذه الدراسة جاءت بعد تمكن (Al-Kubaissi، 2003) من زرعها في العراق ولفترة محدودة أثبتت هذه الدراسة أمكانية الاحتفاظ بالطفيلي ما يقارب (30) يوم وبحيوية تقارب 50% من بداية الحفظ وقد يعود ذلك إلى وضعها في درجة حرارة 4 مْ عدم أمكانية حفظ الطفيلي لفترات أكثر من هذه إلى إن المواد الإفرازية الابرازية للطفيلي وخاصة الأنزيمات الحالة للنسيج تؤثر على حيوية ونشاط الطفيلي نفسه في الزجاج وجرت عدة محاولات لتغيير الوسط الزرعي لإمكانية الاحتفاظ بالطفيلي لفترة أطول ولكن دون جدوى.كما أشارت النتائج ان حقن الأرانب النيوزلندية البيضاء بالمصل الممنع وفر نسبة حماية من الإصابة بخراج الكبد الأميبي بلغت 60% فيما بلغت نسبة الحماية من خراج الكبد الاميبي 66.71% عند التمنيع بخلايا الطحال. ان هذه النتائج تتفق مع ما حصلت عليه (العبيدي، 2009) عند تمنيع الأرانب النيوزلندية بالمواد الإفرازية الابرازية للطفيلي وحقنها بطرق مختلفة (العضلة، التجويف الخلبي وتحت الجلد) والتي بلغت فيها نسبة الحماية (48.77%)، (54.13%) و(38.14)على التوالي وتتفق أيضا مع ما حصل عليه (Al- Kubaissi، 2003؛ Houpt وآخرون، 2004؛ Brooks وآخرون، 2001) الذي أضاف إن التمنيع المباشر بالمستضدات يحفز استجابة مناعية أولية وان إعطاء جرعة ثانية من المستضد يحفز الجهاز المناعي بصورة أعلى وأكفأ من التعرض لمرة واحدة وعزى ذلك إلى وجود خلايا الذاكرة وهذا ما أكده (Brooks وآخرون، 2001) من ان تنشيط الخلايا البلعمية بالمستضد الأميبي يحفزها لإنتاج العديد من الوسائط الخلوية من بينها الانترلوكين (IL-2) الذي يحفز بدوره الخلايا اللمفاوية نوع (Th) المساعدة على تثبيط عامل الهجرة (MIF) الذي له القدرة على الارتباط بالشحوم السكرية Glycolipid الموجود على سطح الخلايا البلعمية ومنع هجرتها بعيدا عن موقع الإصابة. وذكر (Kuby، 1994) إن عامل التنخر (TNF-α) الذي تفرزه الخلايا العدلة له دور في تثبيط هجرة الخلايا وان التمنيع بالمستضدات الأميبية يحفز على إنتاج الأجسام المضادة والتي توفر الحماية ضد الإصابة بخراج الكبد الاميبي.وذكرت (العبيدي، 2009) ان التمنيع بجرعة واحدة من خلايا الطحال في التجويف الخلبي له تأثير على انخفاض وزن كلا من الكبد والطحال بدلالة التضخم. وبالنسبة لتجربة تأثير المصل الممنع على حيوية الاميبا الحالة للنسيج في الزجاج فقد أظهرت التجربة إن للمصل الممنع تأثير على خلايا الاميبا مقارنة بالسيطرة لاحظ جدول (4) وهذا يتفق مع (Al-Kubaissi، 2004؛ Blessman وآخرون، 2003) اللذان ذكرا إن الخلايا اللمفاوية المعزولة من المرضى المصابين بخراج الكبد الأميبي تكون سامة للطور النشط للاميبا وان هذا التأثير يعود إلى المنتجات الخلوية وعند تحفيز الخلايا اللمفاوية بالمستضد تصبح قادرة على قتل الطور النشط للطفيلي ولوحظ أيضا إن الخلايا اللمفاوية المعزولة من الدم المحيطي للمرضى المصابين بخراج الكبد الاميبي تحفز التحول اللمفاوي عند معاملتها بمستخلص الطور الخضري للاميبا الحالة للنسيج في حين لم تستجب الخلايا اللمفاوية من الأشخاص غير المصابين. ونضيف هنا انه قد يكون للمتمم دور في قتل خلايا الاميبا في الزجاج.

المصادر

العبيدي، إسراء عدنان. (2009). التأثيرات المناعية لمستضدات الاميبا الحالة للنسيج على الأرانب النيوزلندية البيضاء،

رسالة ماجستير– كلية التربية للعلــوم الصــرفة– جامعــة الأنبار.

Abd- Alla, M. D. & Ravdin, J. I. (2005). Mucosal Immune response to parasitic infections. In: J. Mestecky 3(ed), Mucosal Immunology, Elsevier, London, United Kingdom. PP. 2096- 2099.

Abd- Alla, M. D.; Jackson, T. F. G. H.; Soong, G. C.; Mazance, M. & Ravdin, J. I. (2004). Identification of the *Entamoeba histolytica* Galactose in habitable lectin epitopes recognized by human Immunoglobulin a antibodies folloeing cure of amoebic liver abscess. J. Microbiol., 72 (7): 3974- 3980.

Abd- Alla, M. D.; Whab, A. A. & Ravdin, J. I. (2000). Comparison of antigen capture ELISA to stool culture in detection for asymptomatic *Entamoeba* species infection in Kafer Daud, Egypt. Am. J. Trop. Med. Hyg., 65:579- 582.

Al- Gumaily, S. K. (1990). Study of the efficiency of vaccination with different antigen from *Toxocara cati, Toxascaris Leonina*. M.Sc. Thesis College Sciences, University of Baghdad.

Al- Hamdani, F. G. N. (1993). Parasitic infection in rural areas around Baghdad city. M.Sc. Thesis, College of Medicine, University of Baghdad.

Al- Kubaissi, A. B. (2002). Immunological epidemiological study of patients infected with *Entamoeba histolytica*. Ph. D. Thesis, College of Science, Al- Mustansiriya University.

Al- Kubaissi, A. B. (2004). Efficiency immunization golden hamster with excretory secretory products of *Entamoeba histolytica*. J. of Anbar. Agri. Sci., 2: 407- 414.

Alder, S. & Foner, A. (1941). Culture of intestinal protozoa. Lancet., 240: 243- 244. (Cited by Taylor, A. E. R. & Baker, J. R. (1969).

Anderson, P. L. (2000). Amoebiasis. Ugesky. Laeger., 162 (11): 1537- 1541.

Asgharpour, A. (2005). Resistance to intestinal *Entamoeba histolytica* infect conferred by Innate Immunity and Gr- It cells. Infect. Dis., 434: 924- 975.

Blessman, J.; Ali, I. K. M. & Tonnu, A. (2003). Longiyudinal study of intestinal *Entamoeba histolytic* infection in asympsomatic adult carries. J. Clin. Microbial., 41: 4745- 4750.

Boettner, D. R.; Huston, C. D. & James, A. S. J. R. (2005). *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* utilize Externalized phosphatidylserine for recognition and phagocytosis of Erythrocytes. Infect. Immun., 73 (6): 3422- 3430.

Brooks, G.; Butle, J. S. & Morse- Jawetz, S. A. (2001). Mclinck and adelbergs medical microbiology. Lange medical books. Mc Graw- Hill Medical Pub. Div. Chapter 8, Immunology, PP.109- 131.

Carrero, J. C.; Cervants- Rebolledo, C.; Guilar- Diaz, H. & Diaz- Gallardo, M. Y. (2007). The role of the security Immune response in the infection by *Entamoeba histolytica* parasite. Immunol., 29 (7): 331- 338 (Abstract).

Denis, M. & Chadee, K. (1989). Human neutrophils activated by interferon and tumor necrosis factor –α kill *Entamoeba histolytica* trophozoites *in vitro*. J. leuko. Biol., 46: 270- 274.

Dodson, J. M.; Clark, C. G. & Lockhart, (1997). Comparison of adherence cytotoxicity, and Gal\ Gal NAc lectin gene structure in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. Parasitol. Int., 46: 225- 235.

Haque, R.; Faruque, A. S. G.; Hahn, A.; Lyerly, D. M.; William, A. & Petri, J. R. (1997). *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection in children in Bangladesh. J. Inf. Dis., 175: 734- 736.

Houpt, E.; Barroso, L.; Lockhart, L.; Wright, R.; Cramer, C.; Lyerly, D. & Petri, W. A. (2004). Prevention amoebiasis by vaccination with the *Entamoeba histolytica* Gal/ Gal Nac lectin. Vaccine., 22: 611: 617.

Hudson, L. & Hay, F. C. (1980). Practical Immunology, 2nd (ed). Black well Scient. Public.

Hussain A. B. (2009). Study of prevelance intestinal parasite in patient visit some hospital of Baghdad. J. Anbar for Pure Sci., 3 (2): 1-11.

Kuby, J. (1994). Immunology. 2nd ed. W. H. freeman and company, New York. P. 245.

Okada, M.; Huston, C. D.; Mann, B. J.; Kta, K. & Nozaki, T. (2005). Proteomic Analysis of phagocytosisin the Enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. Eukaryotic. Cell., 4 (4): 827- 831.

Ravdin, J. I.; Abd- Alla, M. D.; Welles, S.; Reddy, S. & Jackson, T. G. F. H. (2003). Intestinal antilectin Immunoglo bulin antibody response and Immunity to *Entamoeba dispar* infection following cure of amoebic liver abscess. Infect. Immun., 71: 6899- 6905 (Abstract).