اختبار فرط الحساسية المتأخر وعلاقتة بشدة الخمج لمستضدين مختلفين لجنس اللشمانيا

حيدر زهير علي السامرائي و حارث سعيد جعفر الورد
قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة بغداد.

الخلاصة

أختبرت في هذة الدراسة حساسية اختبار فرط الحساسية المتأخر وعلاقتة ببعض معايير الخمج باللشمانيا في مجموعتين من حيوانات الهامستر المحقونة و كالآتي : حقنت المجموعة الأولى بطفيلي اللشمانيا الأحشائية الحية بينما حقنت المجموعة الثانية بلقاح عالق اللشمانيا الجلدية المقتولة بالحرارة .

اظهرت المجموعة الثانية اعلى معدل في تفاعل فرط الحساسية المتأخر (1.5 ±0.23ملم)، واقل المعدلات في كل من معامل الطحال (0.15±2.02)، طول الطحال (0.25±28.3 ملم)، معامل الكبد (0.24±4.47) واعداد الطفيليات في الطحال (0.02±1.8) مليون طفيلي، بينما أظهرت المجموعة الأولى اقل معدل في تفاعل فرط الحساسية المتأخر (1.01 ±0.08مل م)، واعلى المعدلات في كل من نسبة تضخم الطحال (2.45 ±0.15)، طول الطحال (0.01±33 ملم)، معامل الكبد (0.19±5.60) واعداد الطفيليات في الطحال (0.5±11 مليون طفيلي).

يمكن ان تكون هذة النتائج دليلاً على وجود علاقة عكسية بين الأستجابة لأختبار فرط الحساسية المتأخر و بعض معايير شدة الخمج التجريبي باللشمانيا في حيوانات الهامستر الذهبي.

المقدمة

ان اللشمانيا طفيلي ابتدائي سوطي ثنائي المضيف و له طورين: طور امامي السوط (Promastigote) يعيش في امعاء الحشرة الناقلة (Phlebotomus أوLutzomyia) وطور عديم السوط (Amastigote) يعيش ويتكاثر داخل خلايا البلاعم للمضيف الفقري [1]. هناك مظاهر سريرية متعددة (جلدي، جلدي مخاطي ، جلدي منتشرو حشوي) تتسبب عن الأخماج بالأنواع المختلفة التابعة لجنس اللشمانيا[2].

تعتمد المناعة في الأخماج المتسببة عن اللشمانيا بصورة رئيسة على المناعة الخلوية اما المناعة الخلطية فقد اثبتت بأنها فعالة فقط في النوع الحشوي من المرض الا انها غير مجدية في النمط الجلدي من اللشمانيا [3]، ويمكن الأستدلال عن فاعلية المناعة الخلوية في النمطين الجلدي والحشوي بأستخدام اختبار فرط الحساسية المتأخر الذي يكون سالباً ويتحول الى موجب عند الشفاء من اللشمانيا الحشوية[4] و يرتبط تضاؤل الآفة الجلدية مع شدة تفاعل فرط الحساسية المتأخر في اللشمانيا الجلدية[5]. لوحظ ان هناك علاقة بين المقاومة ضد داء اللشمانيات في الفئران والخلايا التائية المساعدة النمط الأول (Th1) والتي ترتبط مع تفاعل فرط الحساسية المتأخر وانتاج كل من الأنترفيرون نوع كاما ، انترلوكين-2 (IL-2) وعامل الورم التنخري- بيتا (TNF-β)، الا ان هذة الأستجابة المناعية يمكن ان تتجة بأتجاة الخلايا التائية المساعدة النمط الثاني (Th2) والتي ترتبط مع الحساسية للمرض وانتاج كل من انترلوكين-4 (IL-4)، انترلوكين-5 (IL-5)، انترلوكين-6 (IL-6)، و انترلوكين-10 (IL-10)، الا ان التوازن بين هاتين الأستجابتين ربما يعتمد على الطريقة المستخدمة في حقن الطفيليات والخلفية الوراثية للمضيف[6,7].

المواد وطرائق العمل

اللشمانيا

اعتمدت العزلة المأخوذة من أحد المصابين والمشخصة على أنها Leishmania tropica من قبل مختبر بحوث الدراسات العليا/ اللشمانيا في كلية العلوم – جامعة بغداد. والعزلة الموصوفة والمشخصة على انها Leishmania donovani والمرقمة AA3 والموجودة في نفس المكان سابق الذكر.

المنابت المستخدمة

1 –المستنبت الهلامي[8] واستخدم لعزل الطفيليات من الإنسان و استرجاعها من الحيوانات المختبرية.

2 –المستنبت ثنائي الطور [9]، استخدم هذا الوسط لتنمية الطفيليات لغرض تهيئة جرع الحقن في الحيوانات وتحضيرالمستضد المستخدم في اختبار فرط الحساسية المتأخر.

الحيوانات المستخدمة

تم توفير 30 حيوان هامستر ذهبي Mesocricetus auratus بعمر 8–10 أسابيع وقسمت الى مجموعتين وكل مجموعة تضمنت 15 حيوان وكالآتي:

المجموعة الأولى: حقنت بطفيلي اللشمانيا الأحشائية الحية وبتركيز 1×10^7 خلية لشمانيا/0.2 مل لكل حيوان.

المجموعة الثانية : حقنت بلقاح عالق اللشمانيا المقتولة بالحرارة (KL) وبتركيز 1×10^7 خلية لشمانيا مقتولة/ 0.2 مل لكل حيوان[10].

حقنت كل من المجموعتين المنوة عزوما آنفاً في باطن القدم الخلفية اليسرى باستخدام أبرة نبيذة سعة 1 مليلتر.

اختبار فرط الحساسية المتأخر

أُجري اختبار فرط الحساسية المتأخر وبحسب طريقة (Guirges)[11] بعد 15 يوم من حقن الحيوانات باللقاحات ومحلول دارئ الفوسفات الملحي، حيث تم حصاد الطفيليات من الوسط الزرعي وغسلت ثلاث مرات بدارئ الفوسفات الملحي ورسبت الطفيليات واضيف لها محلول الفينول الفسيولوجي (0.5 غم فينول /100 مل محلول فسيولوجي وعلقت الطفيليات اذ كان تركيز ها مساويا لـ 25×10^6 طفيلي لكل مل وقد حقن كل حيوان بـ 5×10^6طفيلي لكل 0.2 مل في راحة القدم الخلفية اليسرى وحقنت راحة القدم الأخرى بمحلول الفينول الفسيولوجي فقط وبنفس الحجم واعتبرت كسيطرة. سجل بعد مرور 24 ساعة مقدار التضخم الحاصل في راحة كلا القدمين ومثل الفرق بين القرائتين معامل فرط الحساسية المتأخر وقد تم مراعاة استخدام طفلي اللشمانيا الحشوي بالفينول الفسيولوجي للمجموعة الأولى واستخدام اللشمانيا الجلدي بالفينول الفسيولوجي للمجموعة الثانية ليكون الفحص اكثر نوعيةً.

تقييم شدة الخمج

قيمت شدة الخمج في مجموعتي الحيوانات وكما يأتي:

المجموعة الأولى: لم تحقن بجرع اضافية من اللشمانيا الجلدية الحية (لأنها مخمجة بجرعة اولية).

المجموعة الثانية: حقنت بجرعة مخمجة من اللشمانيا الجلدية بتركيز 5×1^7طفيلي/0.2 مل لكل حيوان (لأنها حقنت بعالق طفيلي اللشمانيا الجلدية المقتولة)

شرحت بعد مرور (30) يوم ثلاث حيوانات من كل مجموعة من المجموعتين سابقة الذكر لتقييم شدة الخمج في المجموعتين المختلفتين وقد تم استخدام المعايير الآتية لمقارنة شدة الخمج في الحيوانات المخمجة وهي :

1. معامل الطحال.[12]
2. الزيادة الحاصلة في معدل طول الطحال[13]
3. معامل الكبد.[13]
4. حساب عدد الطفيليات في طبعات الطحال تحت المجهر حسب طريقة ستاوبر(Stauber) القياسية [14].

التحليل الأحصائي

استخدم معامل بيرسون (Person) لقياس مستوى الأرتباط بين شدة تفاعل فرط الحساسية المتأخر من جهة وكل من معايير شدة الخمج (معامل الطحال، طول الطحال، معامل الكبد وعدد الطفيليات في الطحال) من الجهة الثانية.

النتائج

اختبار فرط الحساسية المتأخر: أظهرت المجموعة الثانية اعلى معدل في الفرق بين سمك وسادة القدم المحقونة بالمستضد وسمك وسادة القدم المحقونة بالفينول سلاين اذ بلغت 1.5±0.23 ملم بينما بلغت 1.01 ±0.08 ملم في المجموعة الأولى. (شكل1).

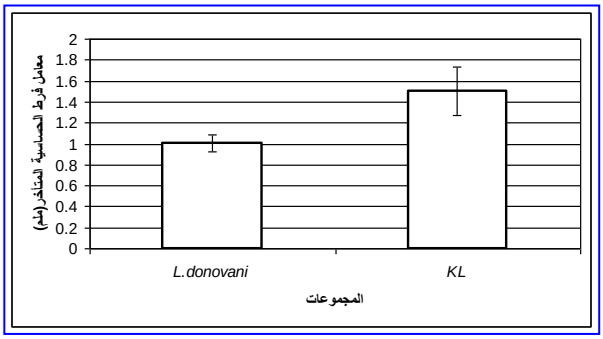
معامل الطحال: كان هناك زيادة ملحوظة في معامل الطحال للمجموعة الأولى مقارنة بالمجموعة الثانية حيث بلغت نسبة معامل الطحال في ها 2.45±0.15 في حين بلغت في المجموعة الثانية 2.02±0.15.(شكل 2).

معدل طول الطحال: وجد ان هناك زيادة ملحوظة في معدل طول الطحال في كل من المجموعتين الأولى والثانية الا ان اعلى معدل طول طحال كان في المجموعة الأولى حيث بلغ 0.01±33 ملم بينما بلغ طول الطحال 0.25±28.3 ملم في المجموعة الثانية.(شكل 3).

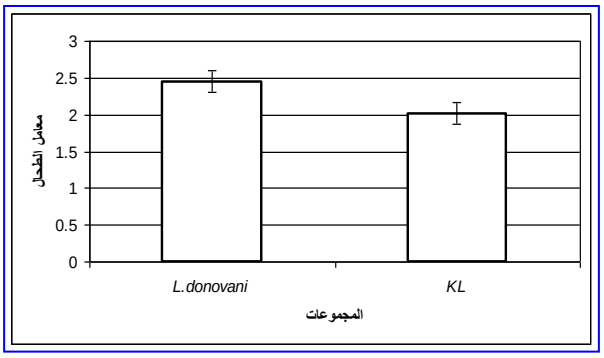
معامل الكبد: تزايد معامل الكبد بشكل ملحوظ في المجموعة الأولى مقارنة بالمجموعة الثانية اذ بلغ 0.19±5.60 في المجموعة الأولى مقابل 0.24±4.47 في المجموعة الثانية.(شكل 4).

اعداد الطفيليات في الطحال :تزايدت اعداد الطفيليات بشكل ملحوظ وكبير في طحال حيوانات المجموعة الأولى اذ بلغت 0.5±11 مليون طفيلي مقابل 0.02±1.8 مليون طفيلي في طحال حيوانات المجموعة الثانية. (شكل 5) وتظهر الأشكال (7,6) الطور عديم السوط في طبعات طحال حيوانات كل من المجموعة الأولى والثانية.

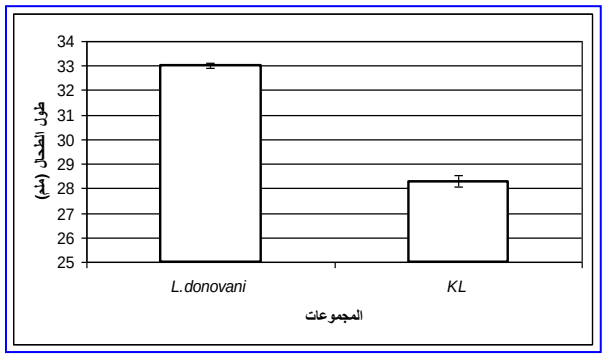
اظهر معامل ارتباط (بيرسون) قيم سالبة وهو دليل على وجود علاقة عكسية واضحة بين شدة تفاعل فرط الحساسية المتأخر من جهة وكل من معايير شدة الخمج (معامل الطحال ، طول الطحال ، معامل الكبدو عدد الطفيليات في الطحال) من جهة اخرى.



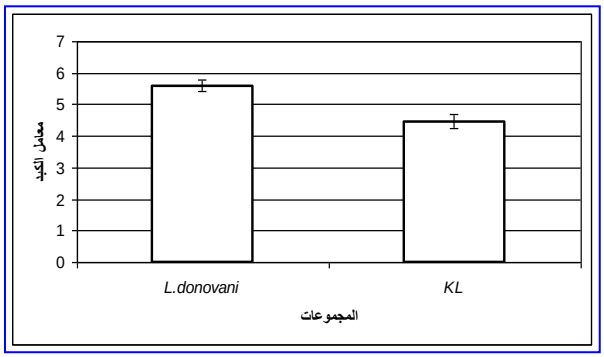
شكل (1) معامل فرط الحساسية المتأخر في مجموعتي حيوانات الهامستر المحقونة بطفيلي اللشمانيا الحيه والمقتولة حرارياً(KL).



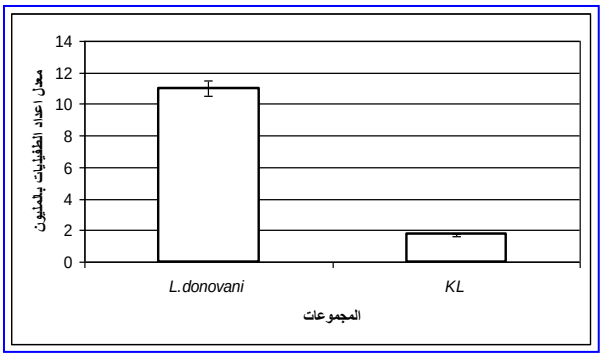
شكل (2) معامل الطحال في مجموعتي حيوانات الهامستر المحقونه بطفيلي اللشمانيا الحيه والمقتوله حرارياً(KL).



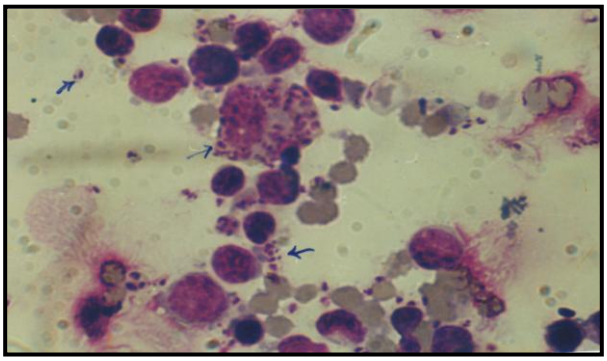
شكل (3) طول الطحال في مجموعتي حيوانات الهامستر المحقونه بطفيلي اللشمانيا الحيه والمقتوله حرارياً(KL).



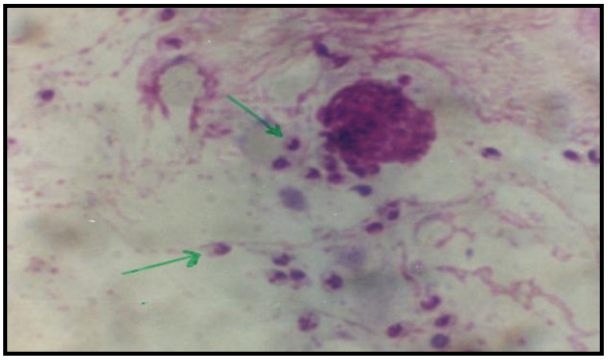
شكل (4) معامل الكبد في مجموعتي حيوانات الهامستر المحقونه بطفيلي اللشمانيا الحيه والمقتوله حرارياً(KL).



شكل (5) اعداد الطفيليات في طحال مجموعتي حيوانات الهامستر المحقونه بطفيلي اللشمانيا الحيه والمقتوله حرارياً(KL).



شكل (6) الطور عديم السوط لطفيلي اللشمانيا الأحشايه في طبعه لطحال هامستر بعد شهرين من الخمج (40X).



شكل (7) الطور عديم السوط لطفيلي اللشمانيا الجلديه في طبعه لطحال هامستر بعد شهرين من الخمج (60X).

المناقشة

اختبر في هذا البحث حيوان الهامستر الذهبي (Mesocricetus auratus) المخمج تجريبياً باللشمانيا الأحشائيه والممنع تجريبياً بلقاح الشمانيا الجلديه المقتوله لمقارنه حساسية هذين المستضدين لأختبار فرط الحساسيه المتأخر وعلاقته بشدة الخمج باللشمانيا الأحشائيه والجلديه.

اظهرت نتائج اختبار فرط الحساسية المتاخر ان المجموعه الثانيه هي الأعلى في م عدل الفرق بين سمك وساده القدم المحقونه بالمستضد وسمك وسادة القدم المحقونه بالفينول سلاين اذ بلغت (0.23±1.5) ملم بينما بلغت (0.8±1.01) ملم في المجموعه الأولى كما ان نتائج شدة الخمج اظهرت تفوقاً واضحا للمجموعه الأولى في كل من معامل الطحال (0.15±2.45)، معدل ط ول الطحال (0.10±33)ملم، معامل الكبد (019.±5.60) و اعداد الطفليات في الطحال (0.5±11) مليون طفيلي مقارنةً مع المجموعه الأخرى. وقد وجد ان هناك علاقه عكسيه من خلال قياس معامل أرتباط (بيرسون) بين الأستجابه لأختبار فرط الحساسية المتأخر ومعايير شدة الخمج باللشمان يا الجلديه والأحشائيه حيث اشارت بعض البحوث الى ان الفحص الموجب لفرط الحساسية المتأخر قد يرتبط مع تضاؤل وانحسار المرض في داء اللشمانيات الجلدي بأنواعه المختلفه وان الفحص السالب لفرط الحساسيه المتأخر يرتبط مع تفاقم المرض [15] كما وان فرط الحساسيه المتأخر يكون سالباً ويتحول الى موجب عند الشفاء من اللشمانيا الحشويه [4]. ان اختيار الجرعه العاليه الحيه المخمجه لطفيلي اللشمانيا الأحشائيه في المجموعه الأولى قد يؤدي الى حدوث حالة من التحمل المناعي وبالتالي تكون شده تفاعل فرط الحساسيه المتأخر قليله ترتبط بشده الخمج الناجم عن زياده انقسام الطفيلي وتفاقمه في الأحشاء [16] كما ظهر في هذا البحث بشكل واضح بينما كان اختيار مستضد مقتول للشمانيا الجلديه سبباً في شده اختبار فرط الحساسية المتأخر والذي يمكن ان يرتبط بزياده الخلايا التائيه المساعده النمط الأول والتي تنتج بدورها مجمو عه من المدورات يمكن ان تؤدي الى تضاؤل الخمج حتى في الأحشاء[17].

المصادر

[1] Lainson, R. and Shaw, J.J." A brief history of genus Leishmania". Cienciae cutura. Vol .44,1992, pp.94-106.

[2] John, D.T. and Petri. "Medical Parasitology". 9th edition. Elsevier Inc. USA ,2006 ,463 pp.

[3] McSorley, S.; Proudfoot, L.; O'Donnell, L. and Liew, F.Y. Immunology of murine Leishmaniasis. Clin. Dermatol. Vol.14, 1996, pp.451-464.

[4] Halder, J.P. ; Ghose, S.K.; Saha, K.C. and Ghose, A.C." Cell mediated immune response in indian Kala-azar and post kala-azar dermal Leishmaniasis". Infect.Immun. Vol. 42, No.2, 1983, pp.702-707.

[5] Dacosta, C.A., Afonso, L.C.C.; Toledo, V.P.C.P.; Gumiareaes, T.M.P.D.; Nascimento, E.; Tavers, C.A.P. and Mayriuk, W. "Immune response and protection induces in mice against American cutaneous Leishmaniasis"., parassaitologia., Vol. 34,1999,pp.45-51.

[6] Cox, F.E.G. "Designer Vaccines for Parasitic Diseases.", Int. J. Parasitol., Vol, 27, No. 10,1997, pp.1147-1157.

[7] Handman, E.". Leishmaniasis: Current Status of Vaccine Development". Clin. Microbiol. Rev., 20001, pp.229-243.

[8] Adler, S. and Theodor, O." Furthur observation on the transmission of cutaneous Leishmaniasis to man from Phlebotomus papatasi. Ann. Trop. Med. parasit., Vol. 20,1923, pp. 175-191.

[9] Kagan, I.G. and Norman, L." Manuel of clinical microbiology" Am. Soc. Microbiol. Washington,1970, pp. 479.

[10] محمد، غنيمة صادق؛ الــورد، حارث سعيد جعفر والشنوي، فوزية أحمد حكمت ، "دراسة في مقارنه القابليه التمنيعيه لخلايا اللشمانيا الجلديه ولقاح الــBCG"، المجلة العراقية للعلوم، المجلد 45 ،العدد 1 ،2007 ، ص 65-70.

[11] Guirges, S.Y. "Natural and Experimental re-infection on man with oriental sore". Ann. Trop. Med. Parasitol, Vol, 65, No2, pp. 197-205.

[12] Stauber, L.A. "Some affect of host environmental on the course of Leishmania in Hamster". Ann. N.Y. Acad. Sci., Vol.56,1953, pp.1064-1069.

[13] Stauber, L.A.." Characterization of strains of Leishmania donovani." Exp. Parasotol. Vol.18,1966, pp.,1-11.

[14] Stauber, L.A.. "Host resistance to Khartoum strains of Leishmania donovani ".Rice.Inst. Pamph. Vol. 45, 1958, pp.80-96.

[15] Mathews. D.J. ;Emson, C.L.; McKenzie, G.J.; Jolin, H.E.; Blakwell, J.M. and McKenzie,A.N.J. "IL-13 Is asusceptibility factor for Leishmania major infection ".J.Immunol., Vol.164,2000,pp.1458-1462.

[16] Tizzard, I.," An introduction to veterinary immunology". W.B. Saunders Company, London,1986, pp. 75.

[17] Awasti, A.; Mathur, R.K. and Saha, B." Immune Response to Leishmania infection". Indian J.Med. Res., Vol.119, 2004,.pp.238-258.