

مقایسه تیتراژ آنتی بادی علیه آمیبیاز در مبتلایان به انتامبا دیسپار و افراد سالم

*دکتر حسین هوشیار، دکتر مصطفی رضاییان، زهرا بابایی
*گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

خلاصه

انتامبا دیسپار آمیبی غیر بیماریزا و فاقد قدرت تهاجم بافتی است که ساکن روده بزرگ انسان می باشد. این آمیب از نظر مرفولوژی کاملاً شبیه گونه بیماریزای انتامبا هیستولیتیکا است. تشخیص آزمایشگاهی این دو آمیب از همدیگر از لحاظ بالینی و در مطالعات اپیدمیولوژی دارای اهمیت زیادی است. به منظور بررسی تیتراژ آنتی بادی علیه آمیبیاز، سرم ۶۰ نفر از مبتلایان به انتامبا دیسپار و ۳۲ فرد فاقد هر گونه آلودگی انگلی، با روش IFA مورد بررسی قرار گرفت. ۱۰۰٪ افراد شاهد سالم و ۹۶/۷٪ مبتلایان به انتامبا دیسپار تیتراهای ۱:۴۰ و پایین تر داشتند. میانگین تیتراژ در هر دو گروه کمتر از ۱:۱۰ محاسبه گردید. آزمون آماری کای اسکوئر (chi-squar) تفاوت معنی داری بین دو گروه نشان نداد. نتایج این بررسی نشان می دهد در افراد مبتلا به انتامبا دیسپار و افراد سالم میانگین تیتراژ آنتی بادی در برابر آمیبیاز شبیه هم و بسیار پایین تر از تیتراژ تشخیصی آلودگی به انتامبا هیستولیتیکا می باشد. کلمات کلیدی: انتامبا دیسپار، انتامبا هیستولیتیکا، تشخیص آزمایشگاهی، IFA، تیتراژ آنتی بادی.

مقدمه

حدود ۱۰٪ افراد مبتلا به گونه بیماریزای انتامبا هیستولیتیکا می باشند (۱۱). با استفاده از میکروسکوپ نوری این دو گونه را نمی توان از هم افتراق داد. اما امروزه با روش های پیچیده و پرهزینه ای نظیر PCR، بررسی الگوی حرکتی ایزوآنزیم ها و نیز پروب های DNA این دو گونه از یکدیگر قابل افتراق می باشد. سازمان جهانی بهداشت توصیه کرده است مطالعات و بررسی ها در جهت ابداع روش های ساده و قابل اجرا در آزمایشگاههای تشخیص طبی برای افتراق این دو آمیب، متمرکز گردد (۱۶).

شواهدی مبنی بر تحریک پاسخ ایمنی اختصاصی در آلودگی به انتامبا هیستولیتیکا و آمیبیاز مهاجم وجود دارد. اگر چه عده ای از محققین کاهش کلونیزاسیون انگل در افراد سرم مثبت در مناطق اندمیک را نشان داده اند اما اعتقاد بر این است که وجود آنتی بادی اختصاصی علیه آنتی ژنهای انتامبا هیستولیتیکا ارتباطی با مقاومت و ایمنی پیشگیری کننده نسبت به آلودگی به این انگل ندارد و آلودگی های مجدد به طور دائم در طول زندگی اتفاق می افتد (۵). با این حال وجود این

آمیبیازیس با ایجاد بیش از ۱۰۰ هزار مورد مرگ و میر در سال، پس از مالاریا و شیستوزوما سومین بیماری انگلی کشنده انسان محسوب می شود (۱۶). تخمین زده شده حدود ۵۰۰ میلیون نفر در جهان آلوده به انتامبا هیستولیتیکا/انتامبا دیسپار هستند. امروزه ثابت شده است که آنچه قبلاً به عنوان انتامبا هیستولیتیکا نامیده می شد، در واقع شامل دو گونه می باشد، یک گونه بیماریزای بالقوه (انتامبا هیستولیتیکا) و گونه دیگر کاملاً غیر بیماریزا (انتامبا دیسپار) است. این دو گونه از نظر مرفولوژیکی کاملاً شبیه همدیگر بوده ولی از نظر بیولوژیکی و رفتار بیماریزایی و در سطح ژنومی با هم تفاوت دارند. انتامبا دیسپار با وجود اینکه در واقع یک انگل همزیست و غیر بیماریزا می باشد و هیچگاه تهاجم بافتی ندارد اما به علت اینکه در تشخیص آزمایشگاهی با انتامبا هیستولیتیکا اشتباه می شود، از اهمیت به سزایی در آزمایشگاه و کلینیک برخوردار است. مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده که ۹۰٪ از جمعیت آلوده، مبتلا به گونه غیر بیماریزای انتامبا دیسپار و

مایع محتوی ترفوزویت های فاز لگاریتمی رشد، به مدت ده دقیقه در دور ۶۰۰g سانتریفوژ گردید و رسوب محتوی انگل را سه بار با بافر PBS شستشو داده و پس از شمارش آمیب ها، رسوب روی لامهای تمیز به صورت قطره ای تثبیت گردید. پس از خشک شدن قطره ها در هوای آزمایشگاه، لامها در کاغذ پوستی لفاف بندی و در دمای °C ۷۰- نگهداری گردید.

در هنگام آزمایش از سرم هریک از افراد با استفاده از PBS (pH=۷/۴) رقت‌های ۱:۱۰، ۱:۲۰، ۱:۴۰، ۱:۸۰، ۱:۱۶۰، ۱:۳۲۰، ۱:۶۴۰ در میکروپلیت تهیه گردید. در این بررسی از آنتی هیومن گلوبولین کنژوگه فلورسئین ایزوتیوسیانات (ساخت شرکت بهرینگ آلمان) استفاده گردید برای اطمینان از صحت نتایج، آزمایش نمونه ها در کنار کنترل مثبت (سرم فرد مبتلا به آمیباز کبدی) و توسط یک نفر انجام و نتایج ثبت گردید. در این بررسی تیتراژ تشخیصی و ملاک بر اساس یافته های قبلی (۲) تیتراژ ۱:۸۰ و بالاتر در نظر گرفته شد. برای محاسبات آماری و مقایسه تیتراژها در دو گروه از آزمون کای اسکور و نیز محاسبه عکس میانگین هندسی عبار آنتی بادی (GMRT) استفاده گردید.

نتایج

از ۶۰ نفر مبتلایان به انتامبا دیسپار ۲۱ نفر (۳۵٪) فاقد آنتی بادی اختصاصی ضد آمیب بودند. ۳۷ نفر تیتراژهای بین ۱:۱۰ تا ۱:۴۰ نشان دادند. تنها ۲ نفر (۳/۳٪) دارای تیتراژ ۱:۸۰ بودند و ۹۶/۷٪ افراد دارای تیتراژ کمتر از ۱:۴۰ بودند (جدول ۱). افراد فاقد آلودگی انگلی (گروه شاهد) ۱۰ نفر (۳۳/۱٪) فاقد آنتی بادی اختصاصی و ۲۲ نفر تیتراژهای بین ۱:۱۰ تا ۱:۴۰ را نشان دادند. در این گروه هیچکس تیتراژ ۱:۸۰ و بالاتر را نشان نداد و ۱۰۰٪ افراد دارای تیتراژ کمتر از ۱:۴۰ بودند (جدول ۱). آزمون آماری X^2 اختلاف معنی داری بین این دو گروه نشان نداد. همچنین GMRT در گروه آلوده به انتامبا دیسپار ۶/۹۲ و برای گروه شاهد ۶/۴۵ محاسبه گردید. لذا تیتراژ میانگین در گروه آلوده به انتامبا دیسپار تقریباً ۱:۷ و در گروه شاهد ۱:۶ است که در هر دو گروه شبیه هم و بسیار پایین تر از تیتراژ تشخیصی (۱:۸۰) می باشد.

آنتی بادی در بدن ارزش تشخیصی دارد. یافتن پاسخ سرولوژیک مثبت در تیتراژهای تشخیصی (۱:۸۰ و بالاتر) با استفاده از روش هایی نظیر اینوفلورسانس غیر مستقیم، همراه با وجود علائم بالینی می تواند راهنمایی برای تشخیص آمیبازیس باشد. همچنین از وجود این آنتی بادی می توان در مطالعات سرواپیدمیولوژی نیز استفاده برد. با توجه به اینکه انتامبا دیسپار از نظر مورفولوژیکی کاملاً شبیه انتامبا هیستولیتیکا می باشد اگر آلودگی به انتامبا دیسپار نیز بتواند باعث تحریک سیستم ایمنی و تولید آنتی بادی به مقدار زیاد و در حد تیتراژهای تشخیصی گردد، ارزش بررسی آنتی بادی ضد آمیب در تشخیص بالینی و مطالعات سرواپیدمیولوژی زیر سوال خواهد بود. بررسی حاضر به منظور پاسخ به این سوال صورت گرفته است که آیا پاسخ ایمنی در افراد آلوده به انتامبا دیسپار باعث تحریک سیستم ایمنی و تولید آنتی بادی اختصاصی ضد انتامبا هیستولیتیکا در تیتراژهای تشخیصی می گردد؟ و آیا اینکه تیتراژ آنتی بادی اختصاصی در این افراد با افراد سالم و فاقد هر گونه آلودگی انگلی تفاوتی ندارد.

مواد و روش کار

در این بررسی از ۶۰ نفر مبتلایان به انتامبا دیسپار که آلودگی آنها با آزمایش میکروسکوپی نمونه مدفوع، تشخیص و با روش PCR-RFLP گونه انتامبا دیسپار مورد تایید قرار گرفته بود (۳)، خونگیری با سرنگ از ورید به عمل آمد. همچنین از ۳۲ نفر کسانی که در سه نوبت آزمایش مدفوع فاقد هر گونه آلودگی انگلی بودند، به عنوان گروه شاهد اقدام به خونگیری شد. پس از سانتریفوژ و جداسازی سلولهای خونی، سرم افراد در لوله های شماره گذاری شده، در فریزر در حالت انجماد تا هنگام آزمایش نگهداری گردید.

جهت بررسی تیتراژ آنتی بادی روش اینوفلورسانس غیرمستقیم (IFA) به کار گرفته شد. برای انجام آزمایش از آنتی ژن فیگوره انتامبا هیستولیتیکا سویه های HK9 و NIH-200 که در محیط کشت آگزنیک TYI-S-33 تکثیر یافته بودند، استفاده گردید (۱). بدین منظور پس از تکثیر انگل،

تیترا آنتی بادی در مبتلایان به انتامبا دیسپار

جدول ۱: مقایسه تیترا آنتی بادی اختصاصی در مبتلایان به انتامبا دیسپار و افراد فاقد هرگونه آلودگی انگلی.

گروه شاهد		افراد آلوده به انتامبا دیسپار		تیترا آنتی بادی اختصاصی آمیب
درصد	تعداد	درصد	تعداد	
۳۱/۳	۱۰	۳۵	۲۱	۰
۴۰/۶	۱۳	۲۵	۱۵	۱:۱۰
۱۵/۶	۵	۲۰	۱۲	۱:۲۰
۱۲/۵	۴	۱۶/۷	۱۰	۱:۴۰
-	-	۳/۳	۲	۱:۸۰
۱۰۰	۳۲	۱۰۰	۶۰	جمع
$X^2=65/2, Df=3, P=0/44$				نتیجه آزمون آماری

گروه آلوده به انتامبا دیسپار: $\bar{x}=1.7$ تیترا میانگین، $GMRT=6/92$

گروه شاهد: $\bar{x}=1.6$ تیترا میانگین، $GMRT=6/45$

بحث

مطالعات جدید نشان داده که پروتئین های زیادی از انتامبا هیستولیتیکا آزاد می شوند که اکثرا اینوزینهای قوی هستند. برای مثال یک پروتئین ۵۱ کیلو دالتونی شبه Calreticulin از ترفوزیت انتامبا هیستولیتیکا جدا شده که در بزاق و سرم بیش از ۹۱٪ افراد مبتلا به این انگل علیه آن آنتی بادی از گروه های IgG و IgM وجود داشته، در حالی که در افراد سالم و حاملین بدون علائم کیست، این میزان تنها ۱۰٪ بوده است (۹). همچنین محققین پاسخ ایمنی در برابر انتامبا هیستولیتیکا را با ترشح IgA مخاطی علیه قسمت کربوهیدراتی لکتین عامل چسبنده این آمیب موثر دانسته اند (۱۰).

بررسی Aceti و همکاران نشان داده که با استفاده از روش الایزا حتی در بزاق افراد مبتلا به آمیباز مهاجم می توان IgA ترشحی در برابر انتامبا هیستولیتیکا را در تیترا های بالا نشان داد در حالی که در افراد فاقد آلودگی انگلی و یا افراد آلوده به گونه غیر مهاجم این آنتی بادی وجود ندارد یا تیترا آن بسیار پایین می باشد (۴). لازم به ذکر است که پاسخ ایمنی در آمیباز باعث مصنوعیت نمی شود اما اندازه گیری این پاسخ می تواند در امر تشخیص و مطالعات سرواپیدمیولوژیک مفید باشد. از آنجایی که پس از درمان، تیترا آنتی بادی در روش IFA سقوط سریعتری نسبت به روش های حساستر دیگر نظیر IHA نشان می دهد استفاده از این روش ارجح تر است (۱۴).

آمیباز یک مشکل بهداشت عمومی در بسیاری از نواحی جهان خصوصا در مناطقی که انتقال مدفوعی - دهانی به علت وضعیت بهداشتی نامناسب یا فقدان آب آشامیدنی سالم به سهولت صورت می گیرد، می باشد. تفکیک انتامبا هیستولیتیکا به دو گونه بیماریزا و غیربیماریزا (انتامبا دیسپار) در دهه گذشته تغییرات زیاد و با اهمیتی در سیمای اپیدمیولوژیک آمیبازیس در سطح جهان ایجاد کرده است (۶).

از آنجایی که انتامبا هیستولیتیکا و انتامبا دیسپار از لحاظ مرفولوژیکی از همدیگر قابل افتراق نیستند، وجود حاملین سالم دفع کننده کیست موجب طرح این سوال می شود که آیا این افراد واقعا در خطر ابتلا به آمیباز مهاجم هستند یا فقط آلوده به گونه غیر بیماریزای انتامبا دیسپار می باشند.

اعتقاد بر این است که ترفوزیت های انتامبا هیستولیتیکا به علت کلونیزه شدن و تماس بیشتر با مخاط و بافت های روده و درگیر کردن آنها باعث به راه افتادن پاسخ ایمنی می شوند در حالیکه انتامبا دیسپار هرگز به submucosa نفوذ نمی کند لذا آلودگی به انتامبا دیسپار به علت عرضه ناکافی آنتی ژن به سیستم ایمنی بدن در خلال عفونت، باعث به راه افتادن پاسخ ایمنی چندانی نخواهد شد و اگر هم باعث مثبت شدن عیار آنتی بادی شود مسلما سطح آنتی بادی در خلال عفونت هیچگاه به سطح آنتی بادی ناشی از عفونت انتامبا هیستولیتیکا نخواهد رسید (۵).

مطالعات سرولوژیک انجام شده روی افراد هموسکسوتل دفع کننده کیست در کشور های غربی نظیر انگلستان هیچ سرم مثبتی یافت نشده است. لذا محققین نتیجه گیری کرده اند که این افراد مبتلا به انتامبا دیسپار هستند. مطالعات انجام شده با روش بررسی الگوی حرکتی ایزوآنزیم ها در این افراد این یافته را تایید کرده است (۸، ۱۳).

از طرف دیگر در کشور ژاپن که موارد آمیبیاز مهاجم در افراد هموسکسوتل زیاد است مطالعه سرولوژی انجام شده با روش های الیزا و ژل دیفوزیون روی افراد هموسکسوتل دفع کننده کیست نشان داده که درصد زیادی از این افراد دارای تیتربالایی از آنتی بادی هستند (۱۵).

یک مطالعه سرواپیدمیولوژی انجام شده قبلی روی ۵۱ نمونه سرم افراد حامل کیست های انتامبا هیستولیتیکا/انتامبا دیسپار در ایران حاکی از وجود درصد بالایی از افراد با تیتربالایی بالای آنتی بادی در برابر آمیب می باشد (۱)، اگر چه در بررسی فوق کیست های جدا شده از افراد تعیین گونه نگردیده است اما با توجه به بالا بودن میزان افراد سرم مثبت و نیز از آنجایی که بعضی از مناطق کشور جزو مناطق گرم و مرطوب و تروپیکال محسوب می شوند به احتمال قوی در این مناطق آلودگی به انتامبا هیستولیتیکا نسبت به سایر مناطق از شیوع بالاتری برخوردار بوده و افراد ساکن در این نواحی نسبت به افراد دیگر در معرض آلودگی بیشتری هستند که لزوم توجه به این مناطق را در برنامه ریزی های بهداشتی ضروری می سازد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از زحمات سرکار خانم فرنیا در قسمت کشت آگزینیک و نگهداری تک یاخته های روده ای صمیمانه تشکر می نمایند.

منابع

۱. حقیقی، علی، کشت آگزینیک انتامبا هیستولیتیکا و تهیه آنتی ژن پیکره ایی و محلول برای روش های IFA و

بررسی فعلی نشان داد میانگین تیتربالایی در مبتلایان به انتامبا دیسپار و افراد سالم هر دو پایین تر از ۱:۱۰ و در واقع منفی می باشد و اختلاف معنی داری در توزیع فراوانی تیتربالایی بادی بین دو گروه دیده نمی شود. در این بررسی ۱۰۰٪ افراد فاقد آلودگی انگلی و بیش از ۹۶٪ افراد آلوده به انتامبا دیسپار فاقد آنتی بادی و یا دارای عیارهای فاقد ارزش تشخیصی بودند بنابراین اگر فردی کیست آمیب را دفع کند و در سرم وی آنتی بادی وجود نداشته باشد یا تیتربالایی بادی پایین باشد، می توان گفت که کیست مشاهده شده مربوط به انتامبا دیسپار می باشد. اما اگر در سرم فردی آنتی بادی علیه آمیب در تیتربالایی ۱:۸۰ و بالاتر مشاهده شود و فرد همزمان مبتلا به علائم باشد یا انگل دفع کند می توان آن آلودگی را احتمالاً مربوط به انتامبا هیستولیتیکا دانست.

ذکر احتمال به این خاطر است که آنتی بادی علیه آمیب مدتی در بدن باقی می ماند لذا حتماً باید تیتربالایی تشخیصی مد نظر قرار گیرد. برای مثال در کشورهایی نظیر مکزیک که انتامبا هیستولیتیکا از شیوع بالایی برخوردار است در تعداد زیادی از افراد سالم و یا مبتلایان به انتامبا دیسپار نیز تیتربالایی بادی مشاهده می گردد که ناشی از آلودگیهای قبلی این افراد به انتامبا هیستولیتیکا است اما تیتربالایی بادی در این افراد از تیتربالایی تشخیصی پایین تر می باشد (۷).

لازم به ذکر است که تیتربالایی تشخیصی آنتی بادی بسته به روش مورد استفاده و منطقه جغرافیایی مورد بررسی تفاوت می کند و در هر کشور یا منطقه این تیتربالایی جداگانه محاسبه و تعیین گردد. یافته های این بررسی با یافته های محققین سایر کشورها نیز همخوانی دارد. برای مثال در یک مطالعه سرواپیدمیولوژی بر روی نحوه پاسخ آنتی بادی ها به زایموم های انتامبا هیستولیتیکا مشخص گردیده که نتایج آزمایشات سرولوژی ۹۴ تا ۱۰۰٪ این افراد مثبت بوده است، در حالی که این میزان در مبتلایان به زایموم های غیر بیماریزا (انتامبا دیسپار) تنها ۲ تا ۴٪ بوده است (۱۲). همچنین در

7. Gatti R., Swierczynski G., Robinson F., *et al.*, 2002, Amebic infections due to the *Entamoeba histolytica*-*Entamoeba dispar* complex: A study of the incidence in a remote rural area of Ecuador., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 67:123-17.
8. Goldmeier D., Sargeant P. G., Price A. B., *et al.*, 1986, Is *Entamoeba histolytica* in homosexual men a pathogen?, *Lancet*, 1:641-4.
9. Gonzalez E., Rico G., Mendoza G., *et al.*, 2002, Calreticulin-like molecule in trophozoites of *Entamoeba histolytica* HM1: IMSS (Swissport:Accession P83003)., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 67:636-39.
10. Haque R., Huston C. D., Hughes M., 2003, Amebiasis., *New Eng. J. Med.*, 348:1565-73.
11. Jackson T. F. H. G., Ravdin J. I., 1996, Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection., *Parasitology Today*, 12:406-409.
12. Markell E. K., John D. T., Krotoski W. A., *Medical Parasitology*, 8th ed., W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1999, 45.
13. McMillan A., Gillmour H. M., McNeillage G., *et al.*, 1984, Amoebiasis in homosexual men., *Gut*, 25:356-60.
14. Rezaian M., Hamzavi Y., 1993, Evaluation of IFA, IHA and BLA test in serological diagnosis of amoebic liver abscess., *M. J. IR* 7:161-4.
15. Takeuchi T., Okuzawa E., Nozaki T., *et al.*, 1989, High seropositivity of Japanese homosexual men for amebic infection., *J. Inf. Dis.*, 159: 808.
16. World health organization, 1997, *Entamoeba taxonomy*. *Bull. WHO.*, 75: 291-292.
- ایزا در تشخیص سرولوژی آمیبیازیس، پایان نامه دکتری انگل شناسی، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۷۷-۷۸
۲. حقیقی، علی، رضاییان، مصطفی، تشخیص آمیبیاز روده ای با استفاده از روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم، مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، جلد ۱۸، شماره ۴، ۱۳۷۳، ۳۹-۳۵.
۳. هوشیار، حسین، شناسایی انتامبا هیستولیتیکا از انتامبا دیسپار با استفاده از تکنیک PCR و تعیین پراکندگی آن در سه منطقه آب و هوایی مختلف ایران، پایان نامه دکتری انگل شناسی، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۸۱-۱۳۸۰.
4. Aceti A., Pennica A., Celestino D., *et al.*, 1991, Salivary IgA antibody detection in invasive amoebiasis and in asymptomatic infection., *J. Inf. Dis.*, 164:613-14.
5. Braga I. I., Mendonca Y., Paiva C. A., *et al.*, 1998, Seropositivity and intestinal colonization with *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in individual in northeastern Brazil., *J. Clin. Microbiol.*, 36:3044-45.
6. Clark C. G., 1998, *Entamoeba dispar*, an organism reborn., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 92:361-364.

دکتر حسین هوشیار

Archive of SID