# استخدام مستخلص يرقات الإسكارس وسائل فقس البيوض كلقاح ضد الإصابة بالديدان الخيطية المعوية للفئران المختبرية BALB/C[+]

# THE EMPLOYMENT OF ASCARIS LARVAE EXTRACT AND OVA – HATCHING FLUID AS AVACCINE AGAINST NEMATODE INTESTINAL INFECTION IN LABORATORY MICE BALB/C

عبد الله لفته المعموري [*]

**Abstract :-**

**The extract of Ascaris larvae has been used as antigens to stimulate the host immunity system to obtain immunization against helminthiasis . The larvae at different stages of mechanical hatching have been used as antigens . The ovulation – hatching fluid has also been used as another antigen for the immunologic stimulation . It has been found that the extracts of both types have the capability of stimulation of immunity system and protection from Ascaris mature ova infection .**

**The number of extracted larvae taken after administered infection dose is used to induce the antigen – immunization .**

**The study has revealed the following findings :-**

1. **Reduction in larvae no. Extracted from immunized mice with larvae extract . The protection rate obtained from injected mice intraperitonealy (IP) was 78% and 66% from those injected intramuscularly (IM) in contrast with the control group**
2. **Reduction in larvae no. Extracted from immunized mice with ova-hatching fluid . The protection rate obtained from injection mice (IP) was 31% and 59% for those injected in the muscles (IM) in contrast with the control group .**
3. **Both antigens from protection against helminthiasis for their hosts by different rates .**

**المستخلص**

**تم استخدام مستخلصات حصل عليها من دودة الإسكارس كمواد مستضدية Antigens لتحفيز الجهاز المناعي للمضيف (الفأر) والحصول على تمنيع Immunization ضد هذه الديدان ، حيث استخدمت اليرقات المفقسة ميكانيكياً بأطوارها المختلفة كمستضدات جسمية ، كما استخدم سائل فقس البيوض كمستضد آخر للتحفيز المناعي ووجد أنه كلا النوعين من المستخلصات كان لها القدرة على تحفيز الجهاز**

[+] تاريخ استلام البحث ٢٠٠٢/٩/١ ، تاريخ قبول النشر ٢٠٠٢/١٢/٢٥

[*] مدرس – المعهد الطبي التقني / بغداد

**المناعي وبالتالي وقاية الفئران Protection من الخمج بالبيوض الناضجة Mature eggs للدودة نفسها (الإسكارس) .**

**وقد كان عدد اليرقات المستخلصة من جسد الفئران الممنعة بعد إعطائها جرعة مخمجة Infection dose هو المؤشر لمستوى التمنيع لهذه المستضدات .**

**وقد تبين من هذه الدراسة ما يلي :-**

1. **حصول اختزال في إعداد اليرقات المستخلصة من الفئران الممنعة لمستخلص اليرقات ، وقد كان نسبة الوقاية المتحققة في الفئران المحقونة داخل البريتون (IP) هي ٧٨% والمحقونة داخل العضلات (IM) هي ٦٦% مقارنة مع مجموعة السيطرة .**
2. **حصول اختزال في أعداد اليرقات المستخلصة من الفئران الممنعة بسائل فقس البيوض وقد كانت نسبة الوقاية المتحققة في الفئران المحقونة داخل البريتون ٣١% وفي العضلات ٥٩% مقارنة مع مجموعة السيطرة .**
3. **إن كلا المستضدين يوفران حماية ضد الإصابة بالديدان الخيطية لمضائفها مع تباين النسب بينهما .**

**المقدمة :-**

يضم هذا الصنف من الديدان أجناساً وأنواعاً كثيرة منها ما هو حر المعيشة ومنها متطفلة على النباتات والحيوانات . وما يهمنا هنا هو الديدان الخيطية المعوية للإنسان وهي أهم الديدان المعوية الطفيلية في الإنسان سواءاً في قدرتها على الانتشار وإمكانياتها الكامنة في إحداث أذى سريري خطير ، وإن جميع الأنواع التابعة لهذه المجموعة الطفيلية من الديدان يمكن أن توجد بمستويات انتشار عالية ولجميعها دورات حياة مباشرة باستثناء الدودة السرمية وإنها جميعاً تنتقل بالتراب أو الغذاء الملوث بمعنى أن البيوض أو اليرقات المسؤولة عن انتقال الإصابة تصبح مخمجة بعد فترة في التربة في حالة توفر الظروف المناسبة لها .

إن العديد من الدراسات التي أجريت في هذا الموضوع بينت العلاقة بين أمراض الحساسية والديدان المعوية : فقد أشار [1] إلى العلاقة ما بين ظهور أنواع من الحساسية وتواجد هذه الديدان داخل جسم المضيف . وأشار [2 , 3] إلى امتلاك الجهاز المناعي للإنسان نوعين من خلايا (T) اللمفية المساعدة (Th1,Th2)، تزداد خلايا النوع الثاني (Th2) عند الأطفال الرضع وفي أمراض الحساسية والإصابة بالديدان المعوية . أن الاستجابة المناعية للإنسان ضد هذه الديدان لها درجة عالية من التشابه (التماثل) للاستجابة التحسسية [4] وذلك بارتفاع مستوى الألرجين ومستوى تركيز الكلوبيولين المناعي IGE ، وحصول حالة من الربو Asthma وارتفاع درجة الحرارة . كما وتوصل [5] إلى ارتفاع في تركيز كل من IgE , IgG4 , IgG1 في الإصابات الشديدة بالديدان .

إن استعراضاً سريعاً للتجارب والبحوث التي أجريت من قبل العديد من الباحثين حول تجارب التمنيع للحيوانات المختبرية ضد هذه الديدان تشير معظمها الى وجود درجات وقاية (حماية) مختلفة ضد الإصابة بهذه الأنواع من الديدان ، فقد أشار [6] الى وجود عوامل ممنعة تؤدي الى ظمور اليرقات وتأخر هجرتها ، كما أشار أيضاً [7] باختزال أعداد اليرقات في المضائف الممنعة . لقد استخدمت مستضدات Antigens وطرق تمنيع Immunization وبرامج حقن Inoculations مختلفة وحيوانات مختبرية صغيرة وكبيرة

الحجم في هذا المجال ، فقد قام [8] باستخدام طريقة تفقيس للبيوض الناضجة ميكانيكياً والحصول على سائل الفقس كمستضد جيد للتحفيز المناعي وقد تم استخلاص أنزيمات مفرزة من يرقات ديدان إسكارس الكلاب Toxcoara canis في الزجاج كمستضدات أيضاً من قبل [9] ، كما سبقهم في هذا المجال [11,10] باستخدام هذه المستخلصات ومستخلصات الديدان البالغة للإسكارس كمحفزات مناعية [14,13,12]. وقد توصل [15,16] الى وجود نوعاً من التشابه في التركيب المستضدي للمواد الجسمية Somatic Materials المنتجة أو المستخلصة من أنواع من الديدان الخيطية

Toxocara Canis, A.Suum , Ascaris Iumbricoides

وأدت جميع هذه التجارب وما توصلت إليه من نتائج إلى تكوين مستويات مختلفة من المناعة الواقية .

**المواد وطرق العمل :-**

تم الحصول على عدد من ديدان الإسكارس الحية والتي حضنت في الزجاج In vitro في محلول فسيولوجي (pbs) ذات أس هيدروجيني (7) PH وبدرجة حرارة (٣٧م°) في حاضنة خاصة لمدة خمسة أيام مع مراقبة حيوية الديدان المستمرة خلال فترة الحضن .

***١- استخلاص البيوض :-***

خلال فترة حضن الديدان في محلول الفوسفيت الدارئ طرحت الديدان الإناث كمية كبيرة من البيوض بمراحل نضج مختلفة ، تم التأكد من وجود البيوض من خلال فحص عدة عينات خلال الأيام الخمسة في سائل الحضن تحت المجهر ، حيث تطرح الدودة البالغة داخل جسم المضيف ما يقارب ٢٠٠٠٠٠ بيضة باليوم الواحد ، فقد عزلت الديدان وأخذ المحلول الفسلجي ووضع في جهاز النبذ (١٥٠٠ دورة/دقيقة) لمدة ثلاث دقائق ، فصل الراسب والحاوي على البيوض وقدر عددها في كل ١سم$^3$ من المحلول .

***٢- حضن البيوض :-***

حضنت البيوض المستخلصة من الخطوة السابقة في درجة حرارة (٢٦م°) لمدة أسبوعين لكي نحصل على بيوض ذات يرقات ناضجة وفحصت عدة عينات من محلول الحضن للتأكد من نضج البيوض بعد انتهاء الفترة الزمنية الكافية .

***٣- فقس البيوض :-***

فقست البيوض وحصل على اليرقات بأطوار مختلفة (L3,L2,L1) تبعاً لطريقة [7] وذلك باستخدام جهاز الهزاز الممغنط Magnetic Stirrer حيث وضع المحلول الفسلجي الحاوي على البيوض الناضجة في بيكر (سعة ١٠٠٠ مل) حاوي على قطع من الثلج للحفاظ على البروتين الذائب من التلف بالحرارة . تم تحديد أعداد اليرقات بعد إزالة سائل الفقس Hatching Fluid والاحتفاظ به بعملية الطرد المركزي (١٥٠٠ دورة/دقيقة) وذلك بفحص ٥ مكررات لكل (0.01سم$^3$) تحت المجهر وحساب معدله .

***٤- تحضير مستخلص اليرقات :-***

بعد الحصول على اليرقات تم استخدام الطريقة السابقة (جهاز الهزاز الممغنط) في تحطيم هذه اليرقات والحصول على مستخلص منها بعد وضعها في بيكر حاوي على ١٥سم٣/محلول pbs ذات أس هيدروجيني [7] ولمدة ٢ ساعة .

***٥- حقن المستضد :-***

تم اختيار (٥٠) فأر بعمر يتراوح ٦-٨ أسابيع قسمت إلى ثلاث مجاميع شملت مجموعة السيطرة الأولى (١٠) فئران لم تعطى أي مستضد ، ومجموعتين كل مجموعة (٢٠) فأر ، حقنت عشرة فئران من المجموعة الأولى بمستخلص اليرقات (0.2 سم$^3$) داخل البريتون IP والعشرة الأخرى نفس المستضد داخل العضلات IM أما المجموعة الثالثة حقنت عشرة منها بسائل فقس البيوض داخل البريتون والنصف الآخر داخل العضلات .

***٦- خمج الفئران :-***

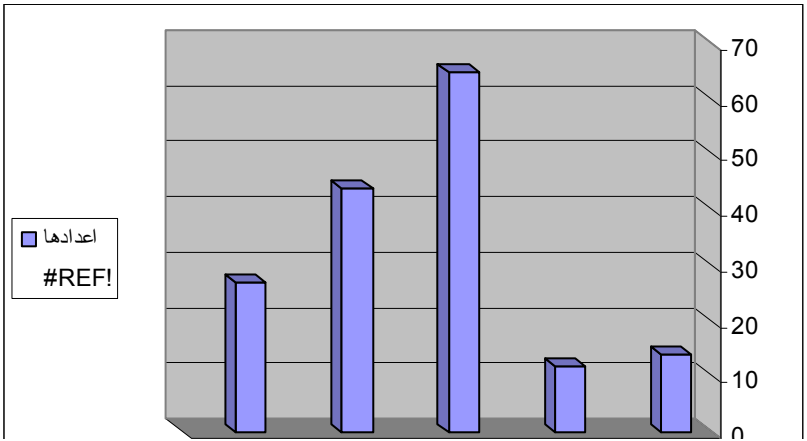
بعد مرور أسبوعين من حقن المستضدات خمجت الفئران جميعاً مع مجموعة السيطرة بجرعة مخمجة عن طريق الفم (١٠٠٠ بيضة ناضجة) لكل فأر بواسطة أنبوبة معقوفة النهاية أعدت لهذا الغرض .
بعد أسبوعين من إعطاء الخمج قتلت الفئران وعزلت عضلات الجسد والكبد والرئتين وجمعت اليرقات منها وحددت أعدادها .

**<u>النتائـــج :-</u>**

أظهرت نتائج هذه الدراسة أن كلا المستضدين المحضرين سبباً اختزال في أعداد اليرقات بنسب متفاوتة ، وهذا يشير الى حصول مناعة لدى هذه الفئران ضد الإصابة بهذه الديدان ، فقد بينت هذه الدراسة حصول مناعة واقية للفئران بنسبة ٧٨% و ٦٦% للفئران الممنعة بمستخلص اليرقات المحقونة داخل الخلب والعضلات وأعطت نسبة تمنيع ٣١% و ٥٠% على التوالي للفئران المحقونة بمستخلص لسائل فقس البيوض والمحقونة أيضاً داخل الخلب والعضلات .

جدول رقم (١) يبين أعداد اليرقات المستخلصة من جسد الفئران الممنعة بمستخلصات من دودة الإسكارس ونسبة الوقاية المتحققة من ذلك

| المجموعة | طريقة التمنيع | نوع المستضد | عدد اليرقات المستخلصة | نسبة الوقاية المتحققة |
|---|---|---|---|---|
| ١ | IP<br>IM | مستخلص اليرقات<br>مستخلص اليرقات | ١٤<br>١٢ | %٧٨<br>%٦٦ |
| السيطرة | --- | | ٦٥ | --- |
| ٢ | IP<br>IM | سائل فقس البيوض | ٤٤<br>٢٧ | %٣<br>%٥٩ |



شكل رقم (١) يبين معدل أعداد اليرقات المستخلصة عند حقن المستضدات عن طريق الخلب (IP) والعضلات (IM) وأعطيت جرعة التحدي (جرعة مخمجة)

**المستضدات المحقونة داخل الخلب والعضلات**

١. يمثل مستضد لمستخلص اليرقات حقن في الخلب .
٢. يمثل مستضد لمستخلص اليرقات حقن في العضلات .
٣. يمثل مجموعة السيطرة .
٤. يمثل مستضد لسائل فقس البيوض حقن في الخلب .
٥. يمثل مستضد لسائل فقس البيوض حقن في العضلات .

**المناقشـــة :-**

من خلال نتائج هذا البحث يمكن القول إن استخدام مثل هذه المستضدات وأنواعاً أخرى يمكـــن اعتبارهـــا كمواد ممنعة تعطي حماية للمضيف وتقيه من الإصابة بالديدان الخيطية . وبعد إجراء دراسات أخرى علـــى هذه المستخلصات يمكن أن تكون هذه المواد لقاحات ضد الديدان الخيطية ، ومن المواد الأخرى التي أعطيت بتجارب سابقة نتائج ملموسة هي مستخلصات من جسم الدودة البالغة فكانت نسبة التمنيع عالية إذ تصل الـــى ٤٠% وذلك بسبب المحتوى البروتيني العالي في هذا المستخلص .

إن اختيار مثل هذه المواد لأجراء دراسات أخرى عليها لتطويرها وجعلها كلقاحات باعتبارها مواد ممنعـــة تكمن في إنها لا تسبب في حدوث خمج عند استعمالها في التمنيع على عكس البيوض الحية والمضعفة . ومن خلال النتائج نرى إن مستخلص اليرقات الذي تم الحصول عليه مـــن تحطـــيم Disintegration اليرقـــات بواسطة جهاز الهزاز الممغنط أعطى أعلى تمنيع بسبب هجرة اليرقات (الحية) من خلال مجرى الـــدم إلـــى أحشاء الجسم المختلفة وبالتالي تعرف الجهاز المناعي إلى تركيبها المستضدي وتكوين الأجسام المضادة لهـــا سلفاً أي قبل إعطاء الجرعة المخمجة .

أعطت مستخلصات سائل فقس البيوض درجة تمنيع أقل ولكن يمكن اعتبارها مواد ممنعة أيـــضاً وذلـــك لاحتوائها على أنزيمات وعلى بروتينات داخل البيضة والمحتوى العالي نسبياً في طبقات قشرة البيضة [18] جعلت هذا المستخلص يعطي درجة من الوقاية ضد الإصابة وهذا يتطابق مع ما توصل إليه [8] باســـتخدامه طرق تفقيس آلية لبيوض ديدان التوكسوكارا وذلك من خلال مقارنة أعداد اليرقات التي استخلصت من جـــسد الفئران وأعضائها الأخرى بعد تشريحها وإذابة هذه الأعضاء (الكبد والرئتين والقلب) في إنزيم الببسين [13]

ومقارنتها مع أعداد يرقات فئران مجموعة السيطرة التي أعطيت جرعة مخمجة فقط . لقد توصل نفس الباحث إلى وجود إنزيم الكايتينيز Chitinase واللايبيز Lipase في سائل فقس بيوض . A. Lumbricoides كما وجد [19] إن سائل فقس بيوض A. Suum يحتوي على إنزيم الكايتينيز الفعال وموجود أيضاً هذا الإنزيم في إسكارس الخنزير وإسكارس الكلاب Toxocara Canis .

ومن ملاحظة نتائج التمنيع نرى إن إعطاء المستضدات داخل العضلات كان أكثر فعالية من حقنة داخل البريتون مما يؤيد إقتراح [20] في دراسته التي أجراها على ديدان التراخينيا Trichinella . وكذلك [13] حول ما توصل إليه من دراسته لليرقات المهاجرة للديدان الخيطية وأماكن تواجدها في أعضاء جسم المضيف .

في هذه الدراسة تم تسليط الضوء على نوعين فقط من المستضدات ومن المؤمل إجراء دراسات أخرى على مستخلصات (مستضدات) جسمية وأيضية لربما كانت أفضل في استثارة الجهاز المناعي .

**المصادر :**


1. Lynch , N.R. "Relationship between helminthic infection and IgE response in a topic and Nonatopic children in a tropical environment" *J. Allergy clin . Immanol* , 101 : 217-221 , 1998 .
2. Gold sby , R. A. " Immunology " Pp . 319 – 322 ; 395 – 412 , 2000 .
3. Turner , K. J. " Non. Specific potentiation of IgE by parasitic infections in man. " *Int. Arch. Allergy Appl . Immunology* 58 : 232 – 236 , 1979 .
4. Moqbel , R. " Parasites and allergy " *Clin. EXP . Allergy* 20 : 611 – 618 , 1990 .
5. Plamer , D. R. " Antibody isotype responses to antigens of Ascaris Lumbricoides in a case – Control study of persistently heavily infected Bangladesh Children " *Parasitology* . 1995sep , 111 (pt3) : 385 – 393 , 1995 .
6. Kerr . k. b. " The cellular response in acquired resistance in guinea – pigs to an infection with pig Ascaris " . *American Journal of hygiene* , 27 : 28 – 51 , 1983 .
7. Sprent , J. F. A. " On the toxic and Allergic manifestations caused by tissues and fluid of Ascaris . Effect of different chemical fractions on worm – free . Infected and sensitized guinea – pig " *Journal of infections disease* , 84 : 146 – 158 , 1950 .
8. Smith , H. V. " Arapid method for hatching infective eggs of Toxocara canis " *Society tropical medicine hygien*e , 83 (2) : 215 , 1989 .
9. Robertson , B. D. " Toxocara canis : Proteolytic enzymes secreted by the infective larvae in vitro " *Experimental Parasitology* ; 69 (1) : 30 – 36 , 1989 .
10. Soulsby , E. J. " The nature and origin of the functional antigens in helminth infection " *Annuls of the New York academy of science* ; 133 : 492 – 509 , 1963 .
11. Urban , J. F. and Romanowski : R. D. "Ascaris Suum Protective immunity in pigs immunized with products from eggs and larvae " *Experimental Parasitology* , 60 : 245 – 254 , 1985 .
12. Fallis , A. M. "Ascaris Lumbricoides infection in guinea – pig with special reference " *Sandian Journal of research* , 26 : 307 – 372 , 1984 .

13. Olson , L. J. " Qrgan distribution of T. canis in normal mice and mice infected previously infected with Toxocara , Ascaris , Trichinella" *Texas report* . *Biology medicine* , 27 : 651 – 656 , 1962 .
14. Fernando , S. T. " Immunological response of rabbits to Toxocara Canis infection" *Parasitology* , 58 : 91 – 103 , 1968 .
15. Kenedy , M. V. " Antigenic relationship between the surface – exposed secreted and somatic materials of the nematode parasites Ascaris lumbricoides , Ascaris suum and Toxocara canis " . *Clinical Experimental immunology* , 75 (3) : 493 – 500 , 1989 .
16. Hommeyer , S. C. " Diagnosis of intestinal ascariasis " , *Abdom – Imaging* , 1995 Jul – Aug ; 20 (4) : 315 – 6 , 1995 .
17. Al – Tae , A. A. Al – Bashir , N. M. and Murad , A. M. " Artificial hatching of Toxocara canis larvae using gut tissue extracts and some chemicals " *Journal of biological science research* , 18 (3) : 47 – 56 , 1987 .
18. Edwards , A. R. "Physiology of the hatching of eggs of Ascaris lumbricoides " *Nature* , 181 : 1410 – 11 , 1958 .
19. Justue , D. E. , and Lvey , M. H. " Chitinase activity in development stages of Ascaris suum and its inhibition by antibody " *Journal of Parasitology* , 55 : 472 – 476 , 1969 .
20. Vernes , A. " Immunization of the mouse and minipig against Trichinella spiralis . In biochemistry parasites and host – parasite relation ship " Pp. : 319 – 324 , 1976 .