

TOKSOKARİAZİSLİ HASTALARDA OTOANTİKOR VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI*

INVESTIGATION OF THE PRESENCE OF AUTOANTIBODIES IN PATIENTS WITH TOXOCARIASIS

Selçuk KAYA¹, Mustafa DEMİRCİ¹, Emel SESLİ ÇETİN¹, Buket CİCİOĞLU ARIDOĞAN¹,
Mehmet ŞAHİN², Tekin TAŞ¹, Metin KORKMAZ³

¹ Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Isparta. (selcuk@med.sdu.edu.tr)

² Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları İmmünoloji Bilim Dalı, Isparta.

³ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir.

ÖZET

Toksokariasis sırasında, larvaların salgılarında bulunan geniş etkili çok sayıdaki enzim nedeniyle dokulara yayılım ve yıkım sonucu immünoopatolojik reaksiyonlar ortaya çıkabilmektedir. Bu çalışmada, parazitin otoimmün reaksiyonları tetiklemesindeki rolünün araştırılması amacıyla, toksokariasisli hastalarda anti-nükleer (ANA), anti-mitokondriyal (AMA ve M2), anti-düz kas (ASMA), anti-nötrofil sitoplazmik (ANCA), anti-miyeloperoksidaz (MPO) ve karaciğer-böbrek mikrozomal tip 1 (LKM-1) antikorları gibi otoantikorların saptanması planlanmıştır. Çalışmaya, klinik bulgular (karın ağrısı, alerjik şikayetler ve/veya eozinofili olup başka bir etken saptanmayan hastalar) ve "in-house" ELISA pozitifliği ile toksokariasis tanısı konulan 40 hasta (22'si erkek; yaş ortalaması: 35.6 ± 10.7 yıl) ve kontrol olarak 32 sağlıklı birey (16'sı erkek; yaş ortalaması: 40.7 ± 11.2 yıl) alınmıştır. ANA (tarama), dsDNA, SS-A, SS-B, Scl-70, LKM-1, MPO ve M2 otoantikorları ELISA yöntemiyle (Euroimmun, Almanya); ANCA, AMA ve ASMA antikorları ise indirekt immünofloresans yöntemiyle (IMMCO, NY) çalışılmıştır. Hastaların 11'inde tek tip, 7'sinde ≥ 2 tip olmak üzere toplam 18 (%45)'inde otoantikor pozitifliği saptanırken, bu oran kontrol grubu için %12.5 (2 olgu ANA tarama, 1 olgu anti-M2, 1 olgu anti-LKM-1 pozitif) olarak belirlenmiş ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($\chi^2 = 5.72$, $p = 0.004$). Hastalardaki otoantikor tiplerinin dağılımına bakıldığında; en fazla pozitiflik ASMA için saptanmış ($n = 6$), bunu anti-dsDNA ($n = 5$), anti-M2 ($n = 5$), anti-SS-B ($n = 4$), anti-LKM-1 ($n = 3$), anti-SS-A ($n = 2$), ANCA ($n = 2$) ve anti-MPO ($n = 1$) izlemiştir. Hasta grubunda ASMA pozitiflik oranının anlamlı düzeyde yüksek olduğu saptanmış ($\chi^2 = 12.24$, $p = 0.03$), diğer her bir otoantikor sıklığı açısından gruplar arasında önemli bir fark tespit edilmemiştir ($p > 0.05$). Bu durumun, kas tutulumunun sık olduğu toksokariastide, larvanın kas dokusunda oluşturduğu hasar sonucu açığa çıkan otoantijenlerden ve/veya parazit ürünlerinin antijenik taklidinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Sonuç olarak, toksokariasisli hastaların yaklaşık yarısında otoantikor pozitifliğine rastlanılabileceği akıldaki tutulmalı ve değerlendirmede bu durum dikkate alınmalıdır.

Anahtar sözcükler: Toxocariasis, Toxocara, otoantikor, ANA, ASMA.

* XXXII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (12-16 Eylül 2006, Antalya)'nde poster olarak sunulmuştur.

ABSTRACT

Immunopathologic reactions may occur during toxocariasis due to tissue invasion and destruction by the secretions of larvae containing various enzymes with broad spectrum. The aim of this study was to search for autoantibodies such as anti-nuclear (ANA), anti-mitochondrial (AMA), anti-smooth muscle (ASMA), anti-neutrophil cytoplasmic (ANCA), anti-myeloperoxidase (MPO) and liver-kidney microsomal type 1 (LKM-1) antibodies in patients with toxocariasis, in order to investigate the role of toxocariasis as a trigger factor for autoimmune reactions. Forty patients (22 were male; mean age: 35.6 ± 10.7 years) diagnosed as toxocariasis by clinical findings (abdominal pain, allergic symptoms and/or eosinophilia, without detection of any other causative agents, and without liver dysfunction, diabetes mellitus, cardiac or renal failure, and autoimmune disease) and in-house ELISA positivity and 32 healthy controls (16 were male; mean age: 40.7 ± 11.2 years) were included to the study. ANA (screen), dsDNA, SS-A, SS-B, Scl-70, LKM-1, MPO and M2 autoantibodies have been investigated by ELISA (Euroimmun, Germany), while ANCA, AMA and ASMA antibodies by indirect immunofluorescence (IMMCO, NY) methods. Autoantibody positivity was detected in 18 (45%) patients of whom 11 yielded a single type, and 7 yielded ≥ 2 types of autoantibodies. This rate was 12.5% for control group (two subjects were positive for ANA-Screen, one for anti-M2 and one for anti-LKM-1). The difference between the total positivity rates in patient and control groups was found statistically significant ($\chi^2 = 5.72$, $p = 0.004$). The most frequent autoantibody type among patients were ASMA ($n = 6$), followed by anti-dsDNA ($n = 5$), anti-M2 ($n = 5$), anti-SS-B ($n = 4$), anti-LKM-1 ($n = 3$), anti-SS-A ($n = 2$), ANCA ($n = 2$) and anti-MPO ($n = 1$). Positivity rate for ASMA was found statistically significant in patients' group compared to controls ($\chi^2 = 12.24$, $p = 0.03$), while there was no significant difference between the groups in terms of other autoantibody rates ($p > 0.05$). These data could be related to the possible release of autoantigens following muscle tissue injury during toxocariasis and/or antigenic mimicry of parasitic products during the infection in which muscle invasion is frequently seen. In conclusion, since autoantibodies are frequently detected in toxocariasis, this situation should be taken into consideration in the presence of autoantibodies.

Key words: Toxocariasis, Toxocara, autoantibody, ANA, ASMA.

GİRİŞ

Toxocara canis, ara konak olarak insanlar da dahil olmak üzere birçok omurgalı ve son konak olarak da köpekçillerde bulunan, dünya üzerinde yaygın olarak dağılmış nematodlardan biridir. İnsanlar kontamine besin, toprak veya ellere bulaşan yumurtaların oral yolla alınmasıyla enfekte olur. İnce bağırsaklarda yumurtadan çıkan larvalar mukozaya penetre olur ve direkt ya da kan yoluyla somatik dokulara göç eder^{1,2}. Enfeksiyonların tanısında serolojik yöntemlerin özgüllüğü, *Toxocara* eksretuar/sekretuar (ES) antijeninin kullanılmaya başlamasından sonra önemli oranda artmıştır. Ancak toksokariasisin tanısı genellikle kesin olarak konulamayabilir. Gelişen ve göç eden larvaya bağlı doku hasarının bazı bulguları olmasına rağmen, çoğu klinik semptom, inflamatuvar yanıt ya da aşırı duyarlılık reaksiyonlarına bağlı olarak gelişmektedir. Dolayısıyla toksokariasisin konağın uygunsuz veya yetersiz immün yanıtı ile ilişkili olduğu söylenebilir^{3,4}. Kronik enfeksiyonlarda parazitin tam olarak temizlenememesi ve antijenik uyarımın uzun süre devam etmesi, konakta otoantikorların oluşmasına yol açabilmektedir⁵⁻⁸. Bu çalışmada, *Toxocara* enfeksiyonlarının otoimmün reaksiyonları tetiklemesindeki rolünün belirlenmesi amacıyla, toksokariasisli hastalarda anti-nükleer (ANA), anti-mitokondriyal (AMA), anti-nötrofil sitoplazmik (ANCA), anti-mikrozomal (Liver-kidney microsome type 1; LKM-1), anti-miyeloperoksidaz (MPO) ve anti-düz kas (ASMA) antikorları gibi otoantikorların varlığı araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, toksokariazis ön tanısı (karın ağrısı, alerjik şikayetler ve/veya eozinofilisi olup başka bir neden saptanamayan hastalar) konulan ve "in-house" ELISA yöntemi ile pozitif bulunan 40 hasta ile kontrol grubu olarak 32 sağlıklı kişi dahil edildi. Hasta ve kontrol gruplarındaki bireylerin hiçbirinde viral hepatit, otoimmün hastalık, kronik sistemik veya enfeksiyon hastalığı ve uzun süreli ilaç kullanımı öyküsü yoktu. Çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Komitesi'nce onaylandı ve katılımcılar bilgilendirildi.

Toxocara ELISA testi, duyarlılığı %78.3 ve özgüllüğü %92 olarak bildirilen yöntemin modifiye edilmesiyle uygulandı⁹. Kısaca, *Toxocara* larvaları, içerisinde 100 U/ml penisilin ve 250 ug/ml streptomisin (Pfizer, İstanbul) içeren RPMI 1640 (Sigma Chemical, ABD) besiyerinde 37°C'de bir hafta inkübe edildi. Bir hafta sonunda ayrıştırılan *Toxocara* ES (Excretory-Secretory) antijenlerini içeren besiyeri 4°C'de iki saat santrifüj edildi (13.000 x G) ve 0.2 p.m por çapı bulunan filtreden süzülerek antijen olarak kullanıldı. Bu antijen 95 µg/ml yoğunlukta ELISA plağına (Costar Highbinding, NY) kaplandı. Test edilecek serumlar 1/100 oranında sulandırıldı. Konjugat olarak alkalen fosfataz ile bağlı anti-insan IgG (Sigma Chemical, ABD) 1/10.000 sulandırımında ve substrat olarak 4-nitrofenil fosfat disodyum tuzu (Merck, Almanya) kullanıldı. Pleytler 405 nm absorpsiyon aralığında mikropalak okuyucuda (Bio-Tek Instruments, ABD) okutuldu. Pozitif sınır değeri olarak, 6 negatif kontrol kuyucuğunun ortalamasına bu negatif kontrol kuyucuklarının 3 standart sapması eklenerek bulunan değer kullanıldı.

Otoantikorların araştırılmasında, ANA-tarama (ANA-screen = dsDNA, histon, nRNP/Sm, Sm, SS-A, SS-B, Scl-70, Jo-1, ribozomal P-protein, sentromer), LKM-1, MPO ve M2 (mitokondri M2 antijeni) antikor tespiti için ticari ELISA yöntemi (Euroimmun, Luebeck, Almanya) kullanıldı. ANA tarama testi ile pozitif bulunan serumlar, dsDNA, SS-A, SS-B ve Scl-70 antikorları açısından her biri için ayrı ELISA testiyle (Euroimmun, Luebeck, Almanya) tekrar çalışıldı. ANCA, AMA ve ASMA antikorları ise indirekt immüno Floresans (IFA) yöntemiyle (ImmuGlo, IMMCO Diagnostics, NY) araştırıldı. Tüm ELISA testlerinde serumlar 1/200 sulandırılırken, IFA testinde 1/40 sulandırımında pozitif bulunanlara ileri sulandırımlar yapıldı. Yöntemler üretici firmaların önerileri doğrultusunda uygulandı.

İstatistiksel değerlendirmede Student's t-testi ve ki-kare testi kullanıldı; $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan hasta ($n = 40$; 22 erkek; yaş ortalaması: 35.6 ± 10.7 yıl) ve kontrol ($n = 32$; 16 erkek; yaş ortalaması: 40.7 ± 11.2 yıl) grupları arasında yaş ve cinsiyet açısından bir fark yoktur ($p > 0.05$). Hastaların 18 (%45)'inde test edilen otoantikorlardan en az bir tanesi pozitif bulunurken, kontrollerin 4 (%12.5)'ünde otoantikor pozitifliği saptanmış ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($\chi^2 = 5.72$, $p = 0.004$) (Tablo I). Otoantikor tiplerinin dağılımına bakıldığında; ASMA hariç diğer tüm otoantikorların sıklığı açısından gruplar arasında istatistiksel bir fark tespit edilmemiş ($p > 0.05$), ASMA pozitiflik oranı ise hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($\chi^2 = 12.24$, $p = 0.03$) (Tablo I).

Tablo 1. Hasta ve Kontrol Gruplarında Saptanan Otoantikorlar ve Pozitiflik Oranları

Otoantikor	Hasta grubu (n= 40) pozitif sayı (%)	Kontrol grubu (n= 32) pozitif sayı (%)	p değeri
ANA-tarama	9 (22.5)	2 (6.2)	> 0.05
dsDNA	5 ^a	0	
SS-A	2	0	
SS-B	4	0	
Scl-70	0	0	
M2	5 (12.5)	1 (3.1)	> 0.05
LKM-1	3 (7.5)	1 (3.1)	> 0.05
MPO	1 (2.5)	0	> 0.05
ANCA	2 ^b (5)	0	> 0.05
AMA	0	0	
ASMA	6 ^c (15)	0	= 0.03 ^e
Toplam	18 ^d (45)	4 (12.5)	= 0.004 ^e

^a Bir olgu SS-A, iki olgu SS-B ile birlikte pozitifdir.
^b Bir olguda titre 1/40, diğerinde 1/80'dir.
^c Üç olguda titre 1/40, iki olguda 1/80, bir olguda 1/160'tır.
^d Yedi olguda ≥ 2 tip otoantikor pozitifliği mevcuttur.
^e İstatistiksel olarak anlamlıdır.

TARTIŞMA

T.canis enfeksiyonlarında larvaların değişik dokulara göç edebilmesi, parazitin salgılarında çok farklı özgülükte birçok enzimin bulunabileceğini düşündürmekte ve özellikle oldukça geniş enzim aktivitesine sahip ES antijeninin elastin, kollajen ve glikoproteinleri yıkıma uğratabileceği belirtilmektedir^{1,10}. Dolayısıyla hastalık sırasında gerek parazitin çok sayıdaki enzimleri ile antijenik benzerlikler nedeniyle gerekse doku yıkımı sonucu oluşan otoantijenlere karşı antikor sentezi mümkün gözükmemektedir. Çalışmamızda, özellikle ASMA antikorları olmak üzere ($p= 0.03$), hasta grubunda saptanan toplam otoantikor pozitiflik oranının (%45) kontrol grubundan (%12.5) anlamlı düzeyde yüksek bulunması ($p= 0.004$), toksokariazis otoimmün reaksiyonları tetikleyebileceğini düşündürmüştür.

Paraziter hastalıklarda aşırı immün yanıtın patogeneze katkıda bulunduğu ifade edilmektedir¹¹. Helmintlere karşı immün yanıtta otoantikorların rolü tam olarak anlaşılamamış olmasına rağmen, onkoserkoziste dolaşan otoantikor veya immün kompleksler ile parazit enfeksiyonunun kliniği arasındaki ilişki gösterilebilmiştir⁷. Obwaller ve arkadaşları⁸, toksokariazisli hastalarda, küçük nükleer ribonükleoproteinlere karşı otoantikorların varlığını ve klinik bulgularla ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir. Buijs ve arkadaşları¹² da *T.canis*'in poliklonal IgE üretimini uyarabileceği, atopik çocuklarda alerjik astım ve egza-ma belirtilerinin ortaya çıkmasına neden olabileceğini bildirmişlerdir.

Toksokariazis sırasında larva migransa bağlı kas tutulumu sırtı ve ağı, güçsüzlük ve kramp gibi miyozit bulguları ortaya çıkabilmektedir². Parazit larvalarının bir inflamatuvar

infiltratla çevrili olması ve bu bölgede lenfosit ve antijen sunan hücrelerin gösterilmesi, larvanın kas dokusundaki hasarına bağlı olarak bazı antijenlerin salındığını, bunun da otoantikor üretimini indüklediğini düşündürmektedir¹¹. “Kronik inflamatuvar sürece aşırı cevap veren hastalarda klinik otoimmün hastalıklar görülür” teorisi göz önüne alındığında, hastalardaki otoantikor varlığının, hasarlı dokudaki yüksek antijen döngüsüne fizyolojik cevabın bir belirtisi olduğu düşünülmektedir¹³. Yapılan bir çalışmada, toksokariazisli hastaların %63.6’sında çizgili kaslara karşı otoantikor pozitifliği saptanmış ve bu durumun, enfeksiyonun uzun süreli olmasına ve kas dokusuna yayılan larvaların oluşturduğu harabiyet sonucu lokal inflamatuvar reaksiyonlara bağlı olduğu ileri sürülmüştür¹⁴.

Çok sayıdaki mitokondriyal antijenlerden biri olan M2’ye karşı antikorlar, primer biliyer siroz başta olmak üzere diğer kronik karaciğer hastalıklarında da ortaya çıkabilmektedir¹⁵. Hastalarımızın hiçbirisinde AMA-IFA testinde pozitiflik saptanmazken, M2-ELISA testinde %12.5 oranında pozitiflik saptanmasının, yöntemlerin özgüllük ve duyarlılık oranlarındaki farklılıktan kaynaklandığı düşünülmüştür¹⁶.

Sonuç olarak, toksokariazisli hastalarda özellikle ASMA olmak üzere otoantikor pozitifliğinin ortaya çıkabileceği ve değerlendirmede akılda bulundurulması gerektiği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Korkmaz M. Toxocariosis, s: 649-62. Özcel MA (ed), Tıbbi Parazit Hastalıkları. 2007. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, İzmir.
2. Magnaval JF, Glickman LT, Dorchie P, Morassin B. Highlights of human toxocariasis. Korean J Parasitol 2001; 39: 1-11.
3. Genchi C, Falagiani P, Riva G, et al. IgE and IgG antibodies in *Toxocara canis* infection. A clinical evaluation. Ann Allergy 1998; 61: 43-6.
4. Magnaval JF, Faber R, Maurieres P, Charlet JP, Larrard B. Evaluation of an immunoenzymatic assay detecting specific anti-*Toxocara* immunoglobulin E for diagnosis and posttreatment follow-up of human toxocariasis. J Clin Microbiol 1992; 30: 2269-74.
5. Hawa M, Beyan H, Leslie RD. Principles of autoantibodies as disease-specific markers. Autoimmunity 2004; 37: 253-6.
6. Demirci M, Tunc SE, Delibas N, Tamer MN, Altuntas I, Korkmaz M. Autoimmune thyroid diseases in patients with chronic fascioliasis. Wien Klin Wochenschr 2003; 115: 182-5.
7. McKechnie NM, Gurr W, Yamada H, Copland D, Braun G. Antigenic mimicry: onchocerca volvulus antigen specific T cells and ocular inflammation. Invest Ophthalmol Vis Sci 2002; 43: 411-8.
8. Obwallner A, Duchêne M, Walochnik J, Wiedermann G, Auer H, Aspöck H. Association of autoantibodies against small nuclear ribonucleoproteins (snRNPs) with symptomatic *Toxocara canis* infestation. Parasite Immunol 2004; 26: 327-33.
9. Glickman L, Schantz P, Dombroske R, et al. Evaluation of serodiagnostic tests for visceral larva migrans. Am J Trop Med Hyg 1978; 27: 492-8.
10. Robertson BD, Bianco AT, McKerrow JH, Maizels RM. *Toxocara canis*: proteolytic enzymes secreted by the infective larvae in vitro. Exp Parasitol 1989; 69: 30-6.
11. Wilson MS, Maizels RM. Regulation of allergy and autoimmunity in helminth infection. Clin Rev Allergy Immunol 2004; 26: 35-50.
12. Buijs J, Borsboom G, van Gemund JJ, et al. *Toxocara* seroprevalence in 5 year-old elementary schoolchildren: relation with allergic asthma. Am J Epidemiol 1994; 140: 839-47.

13. Wilkin T. Autoimmunity: attack or defence? (The case for a primary lesion theory). *Autoimmunity* 1989; 3: 57-73.
14. Macura-Biegun A, Pituch-Noworolska A, Rewicka M, Mrozewicz B, Noworolski J. Antistriational antibodies during *Toxocara canis*, *Trichinella spiralis* infections. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1998; 21: 101-6.
15. Leung PS, Rossaro L, Davis PA, et al; Acute Liver Failure Study Group. Antimitochondrial antibodies in acute liver failure: implications for primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2007; 46: 1436-42.
16. Tonuttia E, Bassetti D, Piazza A, et al. Diagnostic accuracy of ELISA methods as an alternative screening test to indirect immunofluorescence for the detection of antinuclear antibodies. Evaluation of five commercial kits. *Autoimmunity* 2004; 37: 171-6.